

Serologische Untersuchungen
zum Vorkommen von *Yersinia ruckeri*
in Süddeutschland

William Anderson

Disbui. München

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Zoologie und Hydrobiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstände: Prof. Dr. M. Ruf und Prof. Dr. W. Ahne

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Prof. Dr. Dr. habil. R. Hoffmann

Serologische Untersuchungen zum Vorkommen von
Yersinia ruckeri in Süddeutschland

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
William Anderson
aus München

* Die Untersuchungen wurden durch das Bundesministerium für
Ernährung, Landwirtschaft und Forsten dankenswerterweise
unterstützt.

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. Dr.habil. R. Hoffmann

Korreferent: Prof. Dr. J. Gropp

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

Inhaltsverzeichnis	Seite
I. Einleitung	1
II. Literaturbesprechung	2
1. Die Rotmaulseuche der Salmoniden - ERM	2
1.1 Entdeckung und Verbreitung	2
1.2 Biologie von <i>Yersinia ruckeri</i>	7
1.3 Symptome und pathologisch-anatomisches Bild	11
1.4 Diagnose	13
1.4.1 Bakteriennachweis, Isolierung, Anzucht und Anfärbung	14
1.4.2 Serologie	15
1.4.2.1 Agglutination	15
1.4.2.1.1 Objektträgeragglutination	16
1.4.2.1.2 Indirekte Hämagglutination (IHA)	16
1.4.2.1.3 Inerte Partikel-Agglutination	17
1.4.2.1.4 Sonstige Methoden	18
1.4.2.2 Immunofluoreszenzfärbung	18
1.4.2.2.1 Direkte Immunofluoreszenzfärbung	19
1.4.2.2.2 Indirekte Immunofluoreszenzfärbung	19
1.5 Pathogenese und Epizootologie	20
1.6 Pathogenität	24
1.7 Differenzialdiagnose	25
1.8 Fischimmunologie	25
1.8.1 Immunsystem	25
1.8.2 Unspezifische Abwehr	26
1.8.3 Spezifische Abwehr	26
1.8.4 Faktoren, die den Charakter der Immunantwort beeinflussen	27

	Seite
1.9	Vaccinierung 29
III.	Eigene Untersuchungen 30
1.	Material 30
1.1	Bakterien 30
1.2	Fische 31
1.3	Kaninchen 33
1.4	Seren 33
1.4.1	Fischseren 33
1.4.2	Kontrollseren 33
1.5	Reagenzien 34
2.	Methoden 35
2.1	Anzucht des Erregers 35
2.2	Gewinnung der Fischseren 35
2.3	Herstellung und Gewinnung von Immunserum vom Kaninchen 36
2.4	Indirekte Immunofluoreszenz (IFAT) 36
2.5	Agglutination zum Nachweis von Serum-antikörpern gegen <i>Yersinia ruckeri</i> 37
2.5.1	Herstellung der Antigensuspension für die Agglutination 37
2.5.2	Koppelung des Antigens an die Erythrozytenoberfläche 39
2.5.3	Antikörpernachweis 39
2.5.3.1	Die Objektträgerschnellmethode 39
2.5.3.2	Die Mikrotitermethode mittels der Indirekten Hämagglutination 40
3.	Infektionsversuche 41
3.1	Versuchsbedingungen 41
3.2	Inokulation der Versuchstiere 42

	Seite
3.3	Versuchsansätze 42
3.3.1	Erster Versuch als Dosistest 42
3.3.2	Zweiter Versuch als Dosistest 42
3.3.3	Infektionsversuch 43
4.	Ergebnisse 44
4.1	Infektionsversuche 44
4.1.1	Vorversuche 44
4.1.2	Infektionsversuch 44
4.2	Serologische Untersuchungsergebnisse 47
4.3	Vergleich der Objektträgeragglutination und der Indirekten Hämagglutination in der Mikrotiterplatte 59
IV.	Diskussion 60
V.	Zusammenfassung 68
VI.	Summary 69
VII.	Literaturverzeichnis 70
	Lebenslauf 89

1. Einleitung

Die Rotmaulseuche der Salmoniden (ERM) stellt eine generalisierte Infektionskrankheit vor allem der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*) (Ross und Rucker 1966; Bullock und Sniezko 1975) aber auch anderer Fischarten (McArdle und Dooley-Martyn 1985; Schlotfeldt et al. 1985; Michel et al. 1986) dar.

Bis 1981 war die Krankheit auf den Nordamerikanischen Kontinent und Australien begrenzt (Bullock et al 1977). Seither wird aus vielen Teilen Europas zunehmend über seuchenhafte Ausbrüche berichtet, die zum Teil mit hohen finanziellen Verlusten verbunden sind (Schlotfeldt et al. 1985).

In der folgenden Arbeit soll das Vorkommen der ERM bei Salmoniden und Nichtsalmoniden, die als Carrier in Frage kommen, in Süddeutschland ermittelt werden, und es sollen als serologische Nachweismethoden die Objektträgeragglutination und die Indirekte Hämagglutination erprobt werden, um zu beurteilen, ob sie in praxi zur Bestandskontrolle einsetzbar sind.

II. Literaturbesprechung

1. Die Rotmaulseuche der Salmoniden (ERM, Enteric Redmouth Disease, Hagerman Redmouth Disease, Salmonid Blood Spot)

Die Rotmaulseuche ist eine systemische, bakterielle Erkrankung vor allem der Regenbogenforelle, *Salmo gairdneri* Richardson (Ross und Rucker, 1966, Bullock und Sniezko, 1975), deren Verlauf akut oder auch chronisch sein kann (Warren, 1983).

Symptomlose Träger (Carrier) kommen vor (Busch und Lingg, 1975). Als Erreger der Rotmaulseuche wurde *Yersinia ruckeri* sp. nov. (Ewing et al., 1978), ein kleines gram negatives, Oxidase negatives begeißeltes Stäbchen aus Nierenmaterial erkrankter Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) isoliert (Ross et al., 1966).

Eine eindeutige Diagnose ist nur durch die Beurteilung der pathologisch-anatomischen Veränderungen und der Anzucht des Erregers oder mittels serologischer Nachweisverfahren zu stellen (Dulin et al., 1976).

Der Name der Krankheit, << Rotmaulseuche >>, ist recht anschaulich und beschreibt als klassisches Leitsymptom dieser Infektion, Rötungen von Maul und Maulhöhle (Ross et al., 1966; Busch, 1973). Allerdings finden sich vor allem in der chronischen Verlaufsform eine Reihe von sehr variablen, nicht immer auftretenden Veränderungen von Haut, Augen und inneren Organen (Wobeser, 1973).

1.1 Entdeckung und Verbreitung

Erstmals diagnostiziert wurde die Rotmaulseuche (ERM, Enteric redmouth disease) in den frühen 50iger Jahren von Rucker (Rucker, 1966), der die Krankheit bei Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) aus dem Hagerman Tal des Staates Idaho, USA, stammend, entdeckte.

Ross et al. machten sich zur Aufgabe (1966) den Erreger näher zu beschreiben. Erst im Jahre 1978 wurde er der Gattung *Yersinia* zugeordnet (Ewing et al., 1978) und als *Yersinia ruckeri* sp. nov. klassifiziert.

Bis zum Jahre 1981 war ein Auftreten der Krankheit in mindestens 18 der 48 unteren Staaten der USA, in Alaska (Bullock et al., 1978) sowie in den Provinzen British Columbia, Saskatchewan, Ontario und Nova Scotia Kanadas (Bullock et al., 1978, Stevenson und Daly, 1982) als auch in Australien (Bullock et al., 1978; Llewellyn, 1980) beschrieben worden.

Im März 1981 wurde erstmals in Europa der Erreger der Rotmaulseuche aus einer Fischzucht Süd-West-Frankreichs isoliert (Lesel et al., 1983).

Kurz darauf wurde ein Ausbruch von ERM aus Italien (Giorgetti et al., 1985) und Südband (Roberts, 1983) bekannt.

Im August 1981 gelang Fuhrmann die Isolierung des Keims in der Bundesrepublik Deutschland aus Regenbogenforellen in Niedersachsen (Fuhrmann et al., 1983)

Auch aus Norwegen (Roberts, 1985; Frerichs et al., 1985), Dänemark (Dalsgaard et al., 1985) und Finnland (Päivi Rintamäki et al., 1986) wurde über das Auftreten der Yersiniose berichtet.

Im Sommer 1984 wurde aus dem Regierungsbezirk Freiburg der erste Fall von ERM in Südbaden bei Regenbogenseitzlingen beobachtet (Rübsamen und Weis, 1985).

Die Rotmaulseuche, eine systemische Erkrankung vor allem der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*) (Ross et al., 1966), aber auch anderer Salmoniden (Bullock und Snieszko, 1975), im nordamerikanischen Kontinent endemisch (Lesel et al., 1983), droht sich in Europa weiter auszubreiten (Austin und Austin, 1987; Rübsamen und Weis, 1985).

Mittlerweile wurde *Yersinia ruckeri* außer bei Salmoniden auch bei einer Vielzahl von Nichtsalmoniden vornehmlich im Darm gefunden (Schlotfeldt et al., 1985) (siehe Tabelle 1).

Mitchum beschrieb 1981 einen klinischen Fall von ERM bei dem Smaragd Weißfisch (*Notropis atherinoides*) und Michel et al.,



konnten aus zwei Gruppen von Fischen der Art Steinbutt (*Scophthalmus maximus*), die in einer "sea farm" gehalten wurden und petechiale Blutungen aufwiesen, das Bakterium *Yersinia ruckeri* isolieren. Mc Ardle und Dooley-Martyn (1985) konnten während einer Einfuhrkontrolle von Goldfischen (*Carassius auratus*) aus dem Darm den Erreger der Rotmaulseuche isolieren, obwohl die Tiere klinisch gesund schienen.

1986 gelang Michel et al., sogar die Isolierung des Bakteriums aus der Niere erkrankter Köderfische (*Pimephales promelas*), die aus Amerika nach Westeuropa eingeführt wurden, um die europäische Elritze (*Phoxinus phoxinus*) zu ersetzen.

Übertragungsversuche zeigten, daß zum Beispiel Cypriniden nach << einfachem Zusammensein >> im gleichen Wasser mit infizierten und als Carrier bekannten Regenbogenforellen, selbst zum symptomlosen *Yersinia ruckeri* - Träger und Ausscheider wurden (Rodger und Rodgers, 1985).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Yersiniose sich nicht, wie früher angenommen auf die Salmoniden oder gar auf die Regenbogenforelle beschränkt, sondern eine Vielzahl von kultivierten Fischarten heimsucht und möglicherweise durch unerkannte Träger (Carrier) internationale Ausbreitung erlebt.

Abb. 1: An FIM erkrankte Fischarten

<u>Fischart</u>	<u>Autor</u>
Regenbogenforelle (<i>Salmo gairdneri</i>)	Ross und Rucker (1966); Ewing et al. (1978); Bullock et al. (1978); Hunter et al. (1980); McCarthy und Johnson (1982); Stevenson und Daly (1982); Rübsamen und Weis (1985); Daly und Stevenson (1986)
Bachforelle (<i>Salmo trutta</i>)	Dulin et al. (1976); Fuhrmann et al. (1984); Stevenson und Airdrie (1984); Schlotfeldt et al. (1985)
Cutthroat Trout (<i>Salmo clarki</i>)	Ewing et al. (1978); Schäperclaus (1979); Llewellyn (1980); Rübsamen und Weis (1985); Daly und Stevenson (1986)
Atlantischer Lachs (<i>Salmo salar</i>)	Ewing et al. (1978); Schäperclaus (1979); Llewellyn (1980); McCarthy und Johnson (1982); Päivi Rintamäki et al. (1986); Austin und Austin (1987)
Sockeye-Lachs (<i>Oncorhynchus nerka</i>)	Ewing et al. (1978); Schäperclaus (1979); Llewellyn (1980); Rübsamen und Weis (1985)
Chum-Lachs (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	Ewing et al. (1978); Schäperclaus (1979); Austin und Austin (1987)
Königslachs (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>)	Dulin et al. (1976); McCarthy und Johnson (1982); O'Leary et al. (1982); Daly und Stevenson (1986)
Bachsaibling (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	Ewing et al. (1978); Schäperclaus (1979); Llewellyn (1980); Austin und Austin (1987)
Nordamerikanische See- forelle (<i>Salvelinus namaycush</i>)	Stevenson und Airdrie (1982); Daly Stevenson (1986)
Dolly Varden Trout (<i>Salvelinus malma</i>)	Stevenson und Airdrie (1982); Daly Stevenson (1986)
Äsche (<i>Thymallus thymallus</i>)	Schlotfeldt et al. 1985
North American Whitefish (<i>Coregonus clupeaformis</i>)	Stevenson und Airdrie (1982); Daly Stevenson (1986)
Peletmaräne (<i>Coregonus peled</i>)	Päivi Rintamäki et al. (1986)

Tabelle 1: Fortsetzung

Karpfen (Cyprinus carpio)	Austin (1982); Fuhrmann et al. (1984) Rodger und Rodgers (1985)
Goldfisch (Carassius auratus)	McArdle und Dooley-Martyn (1985)
Hasel (Leuciscus leuciscus)	Rodger und Rodgers (1985); Schlot- feldt et al. (1985)
Rotaugen (Rutilus rutilus)	Rodger und Rodgers (1985); Schlot- feldt et al. (1985)
Gründling (Gobio gobio)	Rodger und Rodgers (1985); Schlot- feldt et al. (1985)
Brachse (Abramis brama)	Schlotfeldt et al. (1985)
Fathead minnow (Pimephales promelas)	Michel et al. (1986)
Aal (Anguilla anguilla)	Fuhrmann et al. (1984)
Hecht (Esox lucius)	Schlotfeldt et al. (1985)
Steinbutt (Scophthalmus maximus)	Michel et al. (1986)
Emerald dace (Notropis atherinoides)	Mitchum (1981)
Flußbarsch (Perca fluviatilis)	Schlotfeldt et al. (1985)

Biologie von *Yersinia ruckeri*

Der Erreger der Rotmaulseuche (ERM) der Salmoniden (Ewing et al., 1978, Ross et al., 1978, O'Leary, 1979) wurde erstmals von Ewing et al., (1978) der Gattung *Yersinia*, der Familie der Enterobacteriaceae, zugeordnet

Die Zugehörigkeit zur Familie der Enterobacteriaceae wurde 1966 von Ross et al., vermutet, als sie ein gram negatives Stäbchen, das peritrich begeißelt war und Oxidase negativ reagierte, beschrieben, das sie aus Nieren von an ERM erkrankten Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) isoliert hatten.

Ewing et al. konnten dann 1978 die Zugehörigkeit zur Familie der Enterobacteriaceae bestätigen, indem sie die DNA Struktur des Mikroorganismus untersuchten und das Guanin-Cytosin (G+C) Verhältnis in der DNA bestimmten.

Es wurde eine Antigenverwandtschaft von 30 % zu Spezies der Gattungen *Serratia* und *Yersinia* festgestellt. Das Guanin-Cytosin Verhältnis in der DNA wurde mit 48 % ermittelt und liegt dem Verhältnis der *Yersinia*e bedeutend näher als dem der *Serratia*e.

Es ist dennoch bemerkenswert, daß der Verursacher der ERM der Gattung *Yersinia* zugeordnet wurde obwohl die DNA Verwandtschaft zu *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis* lediglich 30-31 % beträgt. Diese ist vergleichbar mit der zu *Serratia marcescens* und *Serratia liquefaciens*, 24-28% bzw. 31% (Steigerwalt et al., 1976). Auch sind die phänotypischen Charakteristiken von *Yersinia ruckeri* verschieden von denen anderer *Yersinia* Spezies (Bercovier und Mollaret, 1984). Weiterhin muß die Verwandtschaft zu *Salmonella arizonae* in Betracht gezogen werden. So fanden Green und Austin (1982) eine engere phänotypische Verwandtschaft von *Yersinia ruckeri* zu *S. arizonae* als zu *Y. enterocolitica* oder *Y. pseudotuberculosis*. Bercovier und Mollaret (1984) gehen sogar noch weiter und postulieren die Zugehörigkeit zu einer völlig neuen Gattung der Enterobacteriaceae.

Das Bakterium, das aus Niere (Ross et al., 1966; Ewing et al., 1978), Darm und anderen inneren Organen (Rübsamen und Weis, 1985)

ERM kranker Fische isoliert werden kann, stellt geringe Ansprüche an sein Nährmedium und bildet schon nach 24 Stunden Bebrütung bei 37°C auf Normalagar 1-1,5 mm große, glatte, runde, leicht erhabene, glänzende Kolonien von grau-weißer Farbe (Rübsamen und Weis, 1985). Um Mischkulturen zu vermeiden, wurde von Waltman und Shotts (1984) ein Selektivnährboden entwickelt.

Alle *Yersinia* Spezies wachsen bei Temperaturen zwischen 4°C und 42°C wobei das Temperaturoptimum bei 28°C liegt. Während die Spezies *Yersinia ruckeri* phänotypisch homogen ist, weist sie serologische Variationen auf. Es sind bisher fünf Serotypen bekannt (Stevenson und Airdrie, 1984; Daly et al., 1986). Der Serotyp bzw. Serovar I, als "Hagerman strain" bekannt, ist der am häufigsten vorkommende und zugleich der virulenteste Serotyp (Bullock et al., 1978, Mc Carthy und Johnson, 1982). Dem Serotyp II, auch "Oregon strain" oder "Big Creek strain" genannt (O'Leary, 1977; Bullock et al., 1978), der im Gegensatz zum Serotyp I Sorbit fermentiert, wird eine geringere Bedeutung aufgrund seiner schwachen Virulenz zugeordnet (Mc Carthy und Johnson, 1982; Bullock und Anderson, 1984), obwohl er sehr häufig isoliert werden kann (O'Leary et al., 1982). Der Serotyp III, auch "Australian strain" genannt, wurde 1980 von Llewellyn in Australien bei erkrankten Regenbogenforellen entdeckt. Busch (1981) hält diesen Serotyp für avirulent.

Schließlich wurden in Kanada zwei weitere serologische Variationen, der Serotyp UT und der Serotyp V, isoliert (Stevenson und Airdrie, 1984; Daly et al., 1986), deren Bedeutung als Verursacher der Rotmaulseuche noch unklar ist (Daly et al., 1986).

Im Nativpräparat ist eine Vorwärtsbewegung bei 25°C deutlich zu erkennen, nicht aber bei 37°C (Brenner et al., 1976; Ewing et al., 1978; Bercovier und Mollaret, 1984).

Die Zellen sind 1 µm breit und 2-3 µm lang und gram negativ (Ross et al., 1966; Ewing et al., 1978; Rübsamen und Weis, 1985).

Die Zellwand weist ein einschichtiges Mureinnetz und große Mengen an Lipoproteinen und Lipopolysacchariden (O-Antigene) auf. Die Zusammensetzung der Lipopolysaccharid-Protein-Komplexe bestimmt das antigene Verhalten des Bakteriums (Bercovier und Mollaret, 1984).

Die Yersiniaee vergähren Kolenhydrate ohne Gasbildung. Yersinia ruckeri ist als einzige Spezies dieser Gattung in der Lage Gelatine zu verflüssigen (Bercovier und Mollaret, 1984).

Tabelle 2

Die Eigenschaften zur Differenzierung von Yersinia ruckeri nach Ewing et al. (1978), Fuhrmann et al. (1983) und Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 1, (1984) modifiziert.

Pigment	-	Adonit	-
Beweglichkeit (25,37)	+ -	Aeskulin	-
Katalase	+	Arabiose	-
Oxidase	-	Dulzit	-
O/F-Test	+	Fructose	+
H ₂ S-Bildung	-	Callactose	+
Gelatinase	+	Glucose	+
Urease	-	Inosit	-
Citrat (2. tg; 7.tg)	- +	Lactose	-
Lysindecaboxylase (37)	+	Malonat (25,37)	- +
Ornithindecaboxylase	+	Maltose	+
Arginindecaboxylase	+	Mannit	+
ONPG-Test (25,37)	+ -	Mannose	+
Salicin	-	Mellobiose	-
Voges-Proskauer (25,37)+	-	Raffinose	-
Methylrot	+	Saccharose	-
Indol	-	Sorbit	-
Nitrat	+	Sorbose	-
Phenylalanindecaminase	-	Trehalose	+
		Xylose	-

Versuche zur In-Vitro-Resistenz des Bakteriums gegen Chemotherapeutika bzw. Antibiotika ergaben Empfindlichkeit gegen:

1. Chloramphenicol: regelmäßige Empfindlichkeit (Rübsamen und Weis, 1985)
2. Flumequine: regelmäßige Empfindlichkeit (Schlotfeldt et al., 1984)
In der BRD noch nicht zugelassen
3. Oxolinsäure: Regelmäßige Empfindlichkeit (Rübsamen und Weis, 1985)
4. Oxytetracyclin: 70% Empfindlichkeit (Schlotfeldt 1985)
5. Ampicillin: 50% Empfindlichkeit (Schlotfeldt 1985)
6. Trimetoprim/Sulfadimethoxin: 65% Empfindlichkeit (Schlotfeldt 1985)
7. Tribissen/Tiamolin: regelmäßige Empfindlichkeit (M. P. Basse und G. Post 1983)
(Tribissen: Sulfadiazin/Trimethoprim)

Regelmäßige Resistenzen gegen Penicillin (Rübsamen und Weis, 1985) sowie gegen Erythromycin (Rübsamen und Weis, 1985; Bercovier, 1984) und Novobiocin (Bercovier, 1984) wurden festgestellt.

Es muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß trotz zunächst erfolgreich abgeschlossener Therapie, die Rotmaulseuche nach 4-6 Wochen wieder ausbrechen kann (Giorgetti et al., 1985; Horlyck et al., 1985; Schlotfeldt et al., 1985; Roberts, 1985).

1.3

Symptome und pathologisch-anatomisches Bild

Bei der Rotmaulseuche, handelt es sich um eine systemische Erkrankung (Ross et al., 1966; Bullock und Snieszko, 1975), deren Verlauf akut, subakut oder auch chronisch sein kann (Warren, 1983).

So sind auch die Symptome und die Veränderungen der äußeren sowie der inneren Organe erkrankter Fische recht unterschiedlich (Rucker, 1966; Wobeser, 1973).

In akuten Fällen treten häufig als "klassische Leitsymptome" der ERM Rötungen von Maul und Maulhöhle (Hämorrhagien in der Subcutis) in den Vordergrund (Busch, 1973).

Bemerkenswert ist allerdings die Tatsache, daß viele Autoren von akuten ERM Ausbrüchen berichten, bei denen diese Kardinalsymptome nicht festgestellt wurden (Frerichs et al., 1985; Fuhrmann et al., 1983; Rübsamen und Weis, 1985; Schlotfeldt et al., 1985).

Weitere äußere Veränderungen, die zu finden sind, sind Entzündung und Erosion von Unter- und Oberkiefer sowie des Gaumens und Blutergüsse im Zahnfleisch und auf der Zunge. Außerdem finden sich Dunkelfärbung der Haut und Hämorrhagien im Bereich der Flossenbasen. Die Augenveränderungen reichen von ein- oder beidseitigem Exophthalmus mit periokularen Blutungen über Hervortreten der Bulbi aus den Orbita bis zur völligen Trübung des gesamten Auges (Rübsamen und Weis, 1985). Die Tiere leiden an mangelnder Bewegungsintensität und Gleichgewichtsstörungen (Fuhrmann et al., 1983; Lesel und Lesel, 1983; Bullock und Anderson, 1984; Schlotfeldt et al., 1985). Innerlich finden sich Hämorrhagien in Muskel- und Fettgewebe sowie im Darm, der häufig gelbliche gallertige Flüssigkeit enthält. Es kommt zum Bild einer generalisierten Septikämie (Fuhrmann et al., 1983; Lesel und Lesel, 1983; Roberts, 1983; Rübsamen und Weis, 1985; Michel et al., 1986).

Petechiale Blutungen der serösen Häute sowie Oedeme der Magenwand sind zu finden. Milz, Leber und Niere sind häufig

geschwollen (Lesel und Lesel, 1983; Austin und Austin, 1987). Aszites und Enteritis sind weitere regelmäßige Befunde der Sektion (Rubsamen und Weis, 1985; Schlotfeldt et al., 1985). Gelegentlich verursacht die Rotmaulseuche in betroffenen Betrieben lediglich schleichende Dauerverluste geringen Ausmaßes, ohne daß irgendwelche Symptome zu erkennen waren (Roberts, 1985; Schlotfeldt et al., 1985).

Zusammenfassend soll hervorgehoben werden, daß der Verlauf der Rotmaulseuche von volliger Symptomlosigkeit bis hin zum Auftreten einzelner oder vieler, typischer oder unspezifischer Symptome, sein kann (Rucker, 1966; Wobeser, 1973).

Die histopathologische Untersuchung erbringt das Vorliegen einer generalisierten Bakteriämie (Roberts, 1983) mit ausgedehnter Zerstörung der Struktur des renalen hämopoetischen Gewebes, sowie Nekroseherde in Niere, Leber und Milz (Frerichs et al., 1985). Typisch ist die ausgeprägte Enteritis mit Anschoppung von Granulozyten in der Submucosa (Hoffmann, pers. Mitteilung, 1986).

Tabelle 3

Übersicht der Symptome und pathologisch-anatomischen Veränderungen bei der ERM

<u>Verhalten</u>	<u>Haut</u>	<u>Augen</u>	<u>Maulhöhle</u>
mangelnde Bewegungs- intensität; Gleichgewichts- störungen	Dunkelfärbung; Hämorrhagien bzw. petechiale Blutungen ums Maul und an den Flossenbasen	ein- oder beids. Exophthalmus Trübung der Augen; Erblindung	Hämorrhagien und Erosionen in Maulhöhle und Rachen sowie im Bereich der Unter- und Ober- kiefer, des Gau- mens und der Zunge
<u>Bauchhöhle</u>	<u>Magen-Darm-Trakt</u>	<u>Leber, niere, Milz</u>	
Aszites; Rötung des Peritoneums; petech. Blutungen an den serösen Häuten und der Schwimmlase	ödemat. Magenschleim- haut, katarrhalische Enteritis mit Blutung, der Darmschleimhaut; gelblicher, gallertiger Inhalt	Schwellung; zum Teil mit nekrotischen Herden	

Diagnose

Eine Diagnose ist im Falle der ERM nur durch die Beurteilung der pathologisch-anatomischen Veränderungen gekoppelt mit dem direkten Erregernachweis bzw. mittels eines serologischen Nachweises möglich (Dulin et al., 1976).

1.4.1 Bakteriennachweis, Isolierung, Anzucht und Anfärbung

Das verantwortliche Bakterium kann aus der Niere (Ross et al., 1966; Ewing et al., 1978; Hunter et al., 1980; Fuhrmann et al., 1983; Lesel et al., 1983; Roberts, 1983; Warren, 1983; Frerichs et al., 1985; Rübsamen und Weis, 1985), aus der Leber (Hunter et al., 1980; Stevenson und Daly, 1982; Fuhrmann et al., 1983; Frerichs et al., 1985), den Kiemen (Roberts, 1983; Frerichs et al., 1985) dem Darm (Hunter et al., 1980; Warren, 1983; McArdle und Dooley-Martyn, 1985), der Milz (Hunter et al., 1980; Daly et al., 1986), aus dem Herzblut (Roberts, 1983) sowie aus verschiedenen Hautbezirken der Maulhöhle und von den Augen (Rübsamen und Weis, 1985) nahezu in Reinkultur (Ross et al., 1966; McArdle und Dooley-Martyn, 1985; Frerichs et al., 1985; Rübsamen und Weis, 1985) isoliert werden.

Die kulturelle Anzucht gelingt problemlos auf Normalagar (Bercovier und Mollaret, 1984; Rübsamen und Weis, 1985).

Bei 50-75 % symptomloser Carrier kann das Bakterium ausschließlich aus den hinteren Darmabschnitten isoliert werden. Der Erreger wird dann in Zyklen von 36-40 Tagen mit dem Kot ausgeschieden (Busch und Lingg, 1975).

Nach der Gramfärbung, der Beurteilung der Beweglichkeit, der Cytochromoxydasereaktion und der Beurteilung der Fähigkeit Glucose fermentativ im O/F-Medium abzubauen kann eine vorläufige Verdachtsdiagnose gestellt werden, die biochemisch bestätigt werden muß (Bullock et al., 1978; Fuhrmann et al., 1983).

Die biochemischen Eigenschaften sind in Tabelle 2 aufgeführt. Ross et al., (1966) konnten eine peritriche Begeißelung elektronenmikroskopisch nachweisen.

Eine Identifizierung ist auch an Hand des API 20E Systems schnell durchzuführen (Roberts, 1983; Stevenson und Airdrie, 1984; Austin und Austin, 1987). In diesem Falle ist allerdings eine Verwechslung mit *Hafnia alvei* möglich (Austin und Austin, 1987).

1.4.2 Serologie

1.4.2.1 Agglutination

Die Agglutination ist die am häufigsten verwendete serologische Reaktion zur Identifizierung unbekannter Bakterien (Seeliger, 1978).

Die Agglutination wird ferner verwendet zum Nachweis von Antikörpern im Patientenserum mit Hilfe bekannter Bakterienstämme (Widalsche Reaktion; Seeliger, 1978).

Die für die bakteriologische Diagnostik erforderlichen Immunsereen werden meist vom Kaninchen gewonnen (Seeliger, 1978).

Auch zum Nachweis von *Yersinia ruckeri* werden Kaninchen-Anti-*Yersinia ruckeri*-Seren eingesetzt (Bullock et al., 1978; McCarthy und Johnson, 1982; Stevenson und Daly, 1982; Stevenson und Airdrie, 1984).

Es handelt sich um Antiseren gegen das somatische, hitzebeständige O-Antigen von *Yersinia ruckeri* (Anderson et al., 1979; Lamers und Muiswinkel, 1981; Stevenson und Daly, 1982).

Um das O-Antigen freizusetzen, wird das Bakterium vor Applikation an das Kaninchen bei 100°C Hitze behandelt (Anderson et al., 1979; Stevenson und Daly, 1982).

Die Erkennung dieses körperfremden Antigens durch die Lymphozyten erfolgt durch Rezeptoren an deren Oberfläche, die spezifisch mit ihm reagieren. Diese Signalreaktion stimuliert unter anderem die Produktion von antikörperbildenden Zellen (Ingram und Alexander, 1980 und 1985; Schliesser, 1982).

Daß jeder Antikörper nur auf das ihn erzeugende Antigen oder auf ein mit diesem identischen Antigen reagiert (Seeliger, 1978), beruht darauf, daß die Rezeptoren des Antigens und des Antikörpers stereokompatibel sind (Ellis, 1982).

1.4.2.1.1 Objektträgeragglutination

Die Objektträgeragglutination wird oft als "Screening-Test" bei der Prüfung unbekannter Seren verwendet. Hierbei wird ein Tropfen des zu untersuchenden Serums mit einer entsprechenden Menge einer Agarkultur des bekannten Bakterienstammes auf einem Objektträger zusammengebracht. Durch Kippen des Objektträgers (Mischung der beiden Komponenten) erfolgt im positiven Fall innerhalb kurzer Zeit die Bildung von makroskopisch sichtbaren Körnchen (Seeliger, 1978). Diese "Probeagglutination" soll stets durch genauere Agglutinationsproben ergänzt werden (Seeliger, 1978; Stevenson und Daly, 1982; Mc Ardle und Dooley-Martyn, 1985; Daly et al., 1986). Zum Nachweis von Antikörpern gegen *Yersinia ruckeri* wird in der Regel der Referenzstamm ATCC 29473 (Hagermann strain) eingesetzt (Bullock et al., 1978; Anderson et al., 1979; Hunter et al., 1980; McCarthy und Johnson, 1982; Cossarini-Dunier, 1986).

1.4.2.1.2. Indirekte Hämagglutination (IHA)

Die indirekte oder passive Hämagglutination macht sich zu Nutze, daß durch die hohe Reaktionsfähigkeit der Oberfläche von Erythrozyten, diese bei Berührung mit Makromolekülen reagieren, wodurch eine künstliche Koppelung begünstigt wird (Mayr et al., 1977 b). Die meisten Bakterienantigene werden spontan von Erythrozyten adsorbiert (Herbert, 1974; Mayr et al., 1977 b).

Durch einfaches Mischen gleicher Volumina einer gewaschenen 10%-igen Erythrozytensuspension und einer hitzebehandelten *Yersinia ruckeri* Suspension (1mg/ml) gewinnt man die für die IHA benötigten gekoppelten Erythrozyten (Anderson et al., 1979). Das zu untersuchende Serum wird mit den behandelten Erythrozyten zusammengegeben. Anhand der Formation der roten Blutkörperchen kann gesehen werden, ob eine Antigen-Antikörper-Reaktion stattgefunden hat oder nicht. Im positiven Falle ist das "Bild einer Hämagglutination" mit bloßem Auge zu sehen. Befinden sich im Serum keine der gesuchten Antikörper, so bildet sich am Boden der Rund-

bodenplatte ein deutlich zu sehender Erythrozytenknopf. Außer, daß durch diese Methode eine Agglutination sichtbar gemacht wird, bietet sie weiterhin den Vorteil, daß sie schon auf sehr geringe Mengen von Antikörpern im Serum reagiert (Herbert, 1974). Am häufigsten wird in der passiven Hämagglutination das defibrierte Blut von Schafen verwendet (Conrath, 1972; Herbert, 1974; Anderson et al., 1979). Frisch gewonnenes Blut kann drei bis vier Tage nach Entnahme benutzt werden, wenn es bei 4°C gelagert wird. Die gekoppelten Erythrozyten halten weitere drei bis vier Tage. (Herbert, 1974).

Nach der Methode von Nowotny (1969) kann das O-Antigen des Bakteriums an die Trägererythrozyten gekoppelt werden (Anderson et al., 1979).

Um eine quantitative Aussage der Agglutination zu machen, ist die modifizierte passive Hämagglutination in der Mikrotiterplatte nach Conrath (1972) durchzuführen (Hansen und Lingg, 1976). Der Agglutinationstiter wird als reziproker Wert der letzten Verdünnung angegeben, bei der makroskopisch eine Reaktion erkennbar ist (Stevenson und Daly, 1982).

1.4.2.1.3 Inerte Partikel-Agglutination

Wie bei der passiven Hämagglutination, werden bei dieser Methode Antigene an die Oberfläche von inerten Trägersubstanzen gebunden. Solche Substanzen sind sterile Holzkohlepartikel oder Latex-Kugeln. Die Durchführung der Agglutination erfolgt wie bei der IHA (Hansen und Lingg, 1976).

Sie bietet den Vorteil gegenüber der IHA, daß die verwendeten Trägersubstanzen praktisch unbegrenzt haltbar, also gebrauchsfähig sind. Die Sensibilität der Agglutination ist allerdings nicht so groß wie bei der passiven Hämagglutination (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4

Vergleich der Sensibilität verschiedener serologischer Untersuchungsmethoden mit ERM-Antigen und homologen Kaninchen-Imunseren (Hansen und Lingg, 1976)

<u>Test</u>	<u>Titer</u>
Holzkohlepartikelagglutination	1024
Latexagglutination	1024
Objektträgeragglutination	64
Passive Hämagglutination	4096

1.4.2.1.4 Sonstige Methoden

Als weitere Methode, um eine Agglutination makroskopisch sichtbar zu machen, ist die Methode nach Brown et al. (1981) zu nennen. Hierbei wird der Farbstoff Safranin in einer Konzentration von 0,005 % (w/v) dem Verdünnungsmedium PBS zugesetzt, um Antikörper gegen *Yersinia ruckeri* nachzuweisen (Stevenson und Airdrie, 1984).

1.4.2.2 Immunofluoreszenzfärbung

Coons et al. (1941) erprobten erstmals diese Methode zum Nachweis eines Antigens mit Hilfe eines fluorochrom-markierten Antikörpers, wobei der entstandene Antigen-Antikörper-Komplex durch kurzwelliges Licht zum Fluoreszieren gebracht wird. Riggs und Brown (1961) verbesserten das Verfahren mit der Anwendung von Fluoresceinisothiocyanat (FITC), das an Globulin gekoppelt wird (Konjugat). Die Fluoreszenz wird mikroskopisch nachgewiesen.

Die Immunofluoreszenzfärbung bietet die Möglichkeit, eine schnelle, spezifische Diagnose zu treffen und wird zum Nachweis vieler Fischpathogene angewandt (Lewis und Allison, 1971; Johnson et al., 1974).

Es gibt zwei Verfahren, die direkte und die indirekte Immunofluoreszenzfärbung, die in der ERM-Diagnostic gebräuchlich sind (Johnson et al., 1974; Stevenson und Daly, 1982).

1.4.2.2.1 Direkte Immunofluoreszenzfärbung

Sie ist die einfachste Art der Fluoreszenzfärbung. Hier werden die Antigene direkt durch den mit FITC markierten Antikörper nachgewiesen, indem die Präparate (Organabstrich) mit spezifischem markiertem Konjugat überschichtet werden. Nach Entfernen des überschüssigen Konjugats bindet sich der fluoreszierende Antikörper an das zellständige Antigen. Stevenson und Daly (1982) bedienten sich dieser Methode zum Nachweis von *Yersinia ruckeri*.

Diese Färbung ist weniger aufwendig als die indirekte Immunofluoreszenzfärbung (Mayr et al., 1977 b).

1.4.2.2.2 Indirekte Immunofluoreszenzfärbung

Anders als bei der direkten Immunofluoreszenzfärbung, bei der das nachzuweisende Antigen direkt mit dem markierten Antikörper reagiert, wird hier ein nicht markiertes Immuns serum, das spezifische Antikörper aufweist, benötigt. Weiterhin ist ein Spezies-spezifisches Antiglobulinserum mit FITC-markierten Antikörpern (Antispeziesglobulin-Konjugat) erforderlich (Johnson et al., 1974; Mayr et al., 1977 b). Zunächst überschichtet man das Antigen mit nicht markierten Antikörpern. Der dann entstandene Antigen-Antikörper-Komplex wird mit Antispeziesglobulin-Konjugat gefärbt (Rolle und Mayr, 1985). Antigene bzw. antigenhaltige Zellen fluoreszieren dann spezifisch (Rolle und Mayr, 1985).

Diese Methode wurde von Bullock und Stuckey (1975) für die

ERM-Diagnostik herangezogen.

Eine schnelle Verdachtsdiagnose kann von frisch gewonnenen Abklatschpräparaten aus Organen erkrankter Fische mit Hilfe der IFAT getroffen werden (Johnson et al., 1974; Bullock und Sniezko, 1979).

Symptomlose Carrier können durch die Anfärbung von Abstrichen aus den hinteren Darmabschnitten ermittelt werden (Busch und Lingg, 1975; Hunter et al., 1980).

Die indirekte Immunofluoreszenz bietet in der Diagnostik eine Reihe von Vorteilen. Wegen der hohen Spezifität und Sensibilität der Methode kann der Erreger ohne vorhergehende Inkubation (um die Bakterienkonzentration zu erhöhen) nachgewiesen werden (Johnson et al., 1974). Außerdem kann aus kontaminierten Organproben spezifisch der Erreger (hier *Yersinia ruckeri*) bestimmt werden (Cherry et al., 1960).

Ein weiterer Vorzug ist die Tatsache, daß das ERM Bakterium in frisch fixierten Abstrichpräparaten, die bei -23°C gelagert werden, über ein Jahr nachweisbar bleibt. Frische Abstriche die in völliger Dunkelheit gehandhabt werden, können bei 20°C bis zu 24 Stunden gelagert werden, ohne an Fluoreszenz zu verlieren (Johnson et al., 1974).

Weiterhin ist die IFAT der direkten Immunofluoreszenzfärbung überlegen, da sie 5 bis 30 mal empfindlicher reagiert (Mayr et al., 1977 b).

1.5. Pathogenese und Epizootologie

Die Rotmaulseuche ist eine systemische Infektionskrankheit (Ross et al., 1966; Bullock und Sniezko, 1975; Ewing et al., 1978; Roberts, 1983). Sie unterliegt in ihrer Verlaufsform von der Infizierung bis zur Erkrankung einer gesetzmäßigen Ereigniskette (Rolle und Mayr, 1985).

Außer der Virulenz des pathogenen Mikroorganismus und der Empfänglichkeit des Wirtes spielen andere Gegebenheiten eine wichtige Rolle für das Zustandekommen und den Ablauf einer

Infektionskrankheit. Unspezifische innere und äußere Faktoren, die auf den Organismus einwirken und ihn belasten, allgemein zusammengefaßt als Streß (Transport, Futterwechsel, hohe Besatzdichte, schlechte Wasserqualität etc.) spielen in der Pathogenese und Epizootologie der Yersiniose eine wesentliche Rolle (Busch und Lingg, 1975; Dulin et al., 1976; Frerichs et al., 1985; Roberts, 1985; Rubsamen und Weis, 1985; Schlotfeldt et al., 1985).

Ein seuchenhafter ERM-Ausbruch beginnt meist allmählich, endet jedoch mit großen Verlusten (Newman und Majrsarich, 1982), die bis zu 52% kumulieren können, falls keine Gegenmaßnahmen ergriffen werden (Warren, 1983).

Die Rotmaulseuche wird in den westlichen USA für die größten finanziellen Verluste verantwortlich gemacht (Hester, 1973; Busch, 1978). Auch in Europa ist sie für erhebliche wirtschaftliche Verluste ursächlich (Horlyck et al., 1985; Schlotfeldt et al., 1985).

Grundsätzlich stellen beim Fisch Haut und Kiemen sowie die inneren epithelialen Auskleidungen Eintrittspforten für Infektionserreger dar (Munro, 1982; Alexander et al., 1983).

Unklar ist die Frage nach einem eventuellen zyklischen Verlauf der Krankheit und deren Abhängigkeit von der Wassertemperatur. Busch und Lingg (1975) demonstrierten in einem Versuch den Verlauf einer experimentell herbeigeführten *Yersinia ruckeri* Infektion. Die Tiere wurden teils intraperitoneal und teils oral infiziert. In beiden Fällen erkrankten die Fische an ERM. Die ersten Todesfälle traten 6 Tage p.i. auf und klangen 15 Tage p.i. wieder ab. 59 bis 75 Tage nach der Infizierung traten erneut Todesfälle auf.

Aus den hinteren Darmabschnitten von 50 bis 75% der klinisch gesunden Fische konnten 60 bis 65 Tage nach der Infektion die Erreger isoliert werden. Sie stellten somit die inapparenten Carrier dar, die möglicherweise für den erneuten Ausbruch verantwortlich waren. Nach Meinung von Busch und Lingg ist das Ausmaß der Krankheit während der Zyklen abhängig von

saisonal bedingten Wassertemperaturen sowie von Besatzdichte und anderen Stressoren.

Hunter et al. (1980) bestätigten im Wesentlichen die Erkenntnisse von Busch und Lingg in einem weiteren Versuch, in dem die Abhängigkeit der Ausscheidung des Erregers und der Erkrankung empfänglicher Fische demonstriert wurde.

Warren (1983) sieht keine saisonale Abhängigkeit der Krankheit. In Italien wurde die Rotmaulseuche ebenfalls ganzjährig beobachtet (Giorgetti et al., 1985).

Schlottfeldt et al. (1985) berichten über Ausbrüche bei ausgesprochen winterlichen Bedingungen (niedrige Temperaturen).

In Dänemark dagegen wurden vermehrt Ausbrüche bei Temperaturen über 12°C beobachtet (Horlyck et al., 1985).

Manche Autoren berichten, daß die Größe der Fische in direktem Zusammenhang mit der Anfälligkeit für die ERM steht (Rucker, 1966; Dulin et al., 1976; Roberts, 1983; Frerichs et al., 1985; Austin und Austin, 1987). Meist seien Fische mit einer Länge von 7,5 bis 10 cm betroffen (Roberts, 1983; Austin und Austin, 1987), während bei kleineren Tieren die ERM selten eine Rolle spielt (Dulin et al., 1976). Je größer die Fische desto weniger gravierend und eher chronisch verläuft die Krankheit (Austin und Austin, 1987).

Andere Autoren jedoch berichten auch über seuchenhafte Ausbrüche bei größeren Fischen (17 bis 20 cm Länge), die mit deutlichen äußerlichen und innerlichen Veränderungen einhergehen (Rübsamen und Weis, 1985). Auch Fuhrmann et al. (1983) berichten über einen Ausbruch, bei dem Fische mit einer Durchschnittslänge von 29,5 cm betroffen waren. Warren (1983) führt die Anfälligkeit weniger auf die Fischgröße als auf äußere Faktoren zurück, die die Tiere zu bestimmten Zeiten übermäßig belasten (Streß). Unter Umständen kann dieser Streß der Auslöser für den Ausbruch in einer Fischpopulation sein (Bullock und Snieszko, 1975; Dulin et al., 1976; Frerichs et al., 1985; Schlottfeldt et al., 1985).

Knittel (1981) konnte zeigen, daß durch die Exposition subletaler

Dosen von Kupfer die Anfälligkeit der betroffenen Fische höher war als bei ungestreßten Kontrolltieren.

Die horizontale Übertragung scheint gesichert. über eine vertikale Übertragung von *Yersinia ruckeri* über das Ei gibt es keine Berichte (Warren, 1983).

Direkter Fisch zu Fisch Kontakt (homonome Infektion) ist für die Verbreitung der Krankheit nicht nötig. Ross et al. (1966) konnten demonstrieren, daß die ERM durch das Medium Wasser übertragen wird.

Entscheidend für die Übertragung werden persistierende Erregerreservoirs gesehen. Als Infektionsquelle werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert:

- Wasser, bzw. Sediment (Rucker, 1966),
- Carrierfische (Busch und Lingg, 1975; Hunter et al., 1980; McArdle und Dooley-Martyn, 1985; Roberts, 1985; Michel et al., 1986),
- Flußkrebs (*Astacus astacus*) (Warren, 1983)
- Bisamratte (*Ondatra zibethica*) (Stevenson und Daly, 1982)

1.6 Pathogenität

Dem "Hagerman strain" wird die größte Virulenz zugeschrieben und er ist zugleich der am häufigsten isolierte Serotyp aus ERM kranken Fischen (Bullock et al., 1978; McCarthy und Johnson, 1982; Daly und Stevenson, 1986; Austin und Austin, 1987). Regenbogenforellen, die intraperitoneal mit $2,5 \times 10^6$ Keimen beimpft werden, sterben zu 92% nach 24 Stunden bei einer Wassertemperatur von 18°C (McArdle und Dooley-Martyn, 1985). Die LD-50 wurde mit $3,0 \times 10^5$ Keimen ermittelt (Austin und Austin, 1987). Die Virulenz des Serotyps II (O'Leary strain) ist umstritten. McCarthy und Johnson (1982) befinden ihn für avirulent. Auch Bullock und Anderson (1984) messen diesem Serotyp keine große Bedeutung zu, während O'Leary et al. (1982) die Beobachtung machten, daß er an ERM-Ausbrüchen bei Königslachsen (*Oncorhynchus tshawytscha*) maßgeblich beteiligt war. Seine LD-50 liegt bei $1,0 \times 10^7$ Keimen (Austin und Austin, 1987). Der Serotyp III (Australian strain) wurde bisher nur in Australien (Llewellyn 1980) und in Kanada (Daly und Stevenson, 1986) isoliert. Auch seine Bedeutung als Verursacher der Krankheit ist unklar. Stevenson und Airdrie (1984) befinden ihn für eine atypische Variante des Serotyps I. Über die Virulenz der anderen Serotypen herrscht Unklarheit (Austin und Austin, 1987).

1.7 Differentialdiagnose

Differentialdiagnostisch zur ERM sind eine Reihe von Krankheiten mit ähnlichen Erscheinungsbildern, aber anderer Ätiologie zu berücksichtigen.

- Infektiöse Hamatopoetische Nekrose (Ahne, 1980; Amlacher, 1986; Yasutake, 1975),
- Virale Hämorrhagische Septikämie (Ahne, 1980; Amlacher, 1986; Yasutake, 1975),
- Vibriose (akute Form) (Amlacher, 1986; Roberts, 1978),
- Furunkulose (Amlacher, 1986; Roberts, 1978),
- Bakterielle Nierenerkrankung der Salmoniden (Amlacher, 1986; Roberts, 1978; Schauner, 1985).

1.8 Fischimmunologie

1.8.1 Immunsystem

Dem Fisch stehen in der Auseinandersetzung mit krankmachenden Erregern bzw. Substanzen Immunmechanismen zur Verfügung, die denen höherer Wirbeltiere ähnlich sind (Schäperclaus, 1979; Ellis, 1982). Sie unterscheiden sich insofern, als sie bei Poikilothermen naturgemäß temperaturabhängig sind (Bisset, 1948; Avtalion et al., 1973; Ellis, 1982).

Analog zum Säuger, sind die Milz und der Thymus der Fische Bildungsstätten von Zellen der lymphatischen Reihe. Die Niere stellt beim Knochenfisch ein weiteres, wichtiges, lymphoides Organ dar. Sie besitzt Funktionen sowohl des Knochenmarks als auch der Lymphknoten höherer Vertebraten, beides Organe, die den Teleostern fehlen (Ingram und Alexander, 1981; Ellis, 1982).

1.8.2 Unspezifische Abwehr

Die unspezifische Abwehr oder Resistenz des Fisches besteht aus zwei funktionell eng miteinander verflochtenen Mechanismen. Es sind die zellulären und die humoralen Abwehrsysteme. Träger der zellulären Abwehr sind die Phagozyten und die Granulozyten, die bei infektiösen Prozessen in der Lage sind, in das Gewebe auszuwandern (Post, 1963; Klontz et al., 1965; Ellis, 1982). Die Phagozytose kann bei der Regenbogenforelle ab dem 4. Lebenstag nachgewiesen werden (Manning et al., 1982). Zu den humoralen Resistenzfaktoren zählen beim Fisch das Komplementsystem, das Properidin (Alternativer Komplementweg), sowie C-reaktives Protein, Lysozyme, Interferon und natürliche Hämolysine (Dorson et al., 1975; Anderson et al., 1979; Ellis, 1982).

1.8.3 Spezifische Abwehr

Die Immunität der Fische setzt sich ebenfalls aus zellulären und humoralen Mechanismen zusammen (Schäperclaus, 1979). Sie stellt sich in vier Hauptparametern dar, die die Knochenfische besitzen (Ellis, 1982):

1. Die Fähigkeit, spezifische Immunglobuline zu bilden,
2. die zellgebundene Immunität,
3. die sofortige und die verzögerte Hypersensitivität,
4. das immunologische Gedächtnis.

Für die Existenz von B- und T-Lymphozyten wie bei den höheren Vertebraten gibt es beim Fisch nur Vermutungen (Ellis, 1977 und 1982). Etlinger et al. (1976) konnten demonstrieren, daß Thymozyten durch T-Zell-Mitogene, aber nicht durch B-Zell-Mitogene stimuliert werden (Jurd, 1985), während die Lymphozyten der Vorniere genau umgekehrt reagieren (Ingram und Alexander, 1980). Die Lymphozyten der Milz werden durch beide Mitogene stimuliert (Ellis, 1982). Eine Helferzell- und Suppressorzellfunktion nach Antigenkontakt wird zumindest beim Karpfen (*Cyprinus carpio*)

angenommen (Wishkovsky und Avtalion, 1982).

Träger der humoralen Immunität ist ein einziges, dem IgM der Sauger ähnliches Immunglobulin. Die IgM ähnlichen Antikörper kommen teils als Monomere teils als Tetra- bzw. Pentamere vor (Ellis, 1982). Nach Schaperclaus (1979) ist das "IgM" der Fische nicht fähig, Komplement zu binden und besitzt eine hohe Antigenspezifität und -affinität.

Die Immunglobuline der Fische bestehen aus Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Je zwei schwere (MG 50-77000) und zwei leichte (MG 25000) Ketten bilden eine Einheit, die sich zum Antikörper zusammenlagern. Bei den Knochenfischen wird von Immunglobulinen mit Sedimentationskoeffizienten von 19 S, 16 S, 7 S und 6,4 S berichtet (Ellis und Schlotfeldt, 1985).

Bemerkenswert ist, daß die Antikörperproduktion kein Parameter zur Beurteilung des Immunstatus beim Fisch ist (Amend und Johnson, 1984). Fische, die mit *Vibrio anguillarum* und *Yersinia ruckeri* geimpft wurden, wiesen zum Teil trotz hoher Serummater, eine hohe Anfälligkeit gegenüber den virulenten Erregern auf. Andere Fische hatten zwar einen niedrigen Antikörpertiter im Serum, aber dafür eine gute, belastbare Immunität entwickelt (Fryer et al., 1978; Johnson et al., 1982). Zu entsprechenden Ergebnissen kam Müller (1986) im Falle der BKD.

M. Cossarini-Dunier (1986) befindet, daß im Falle der ERM zwischen zirkulierenden Antikörpern und Immunität keinerlei Korrelation besteht. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen McCarthy und Paterson (1980) im Falle der Furunkulose.

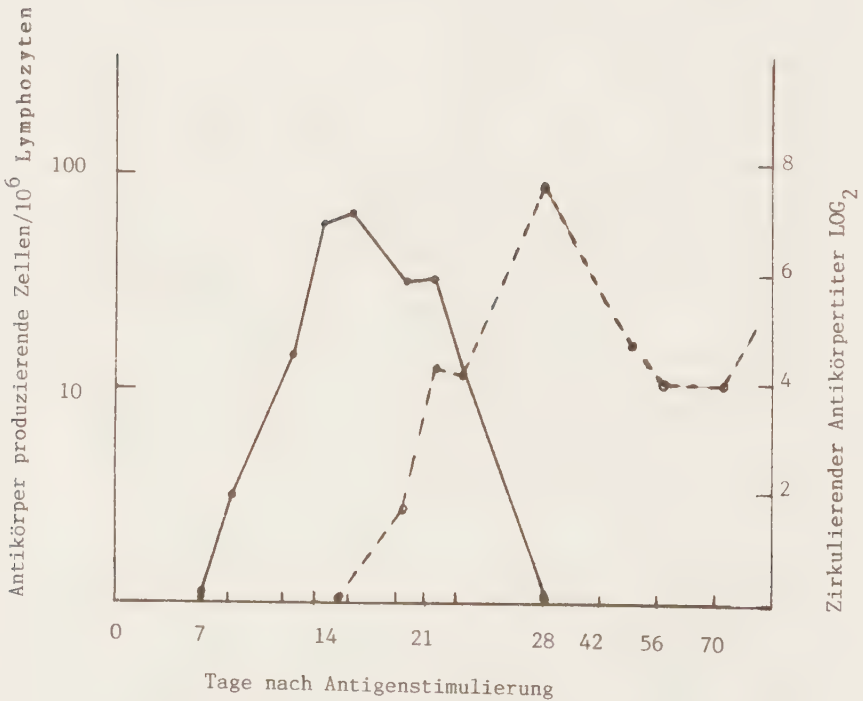
1.8.4 Faktoren, die den Charakter der Immunantwort beeinflussen

Die Umgebungstemperatur ist für die Antikörperproduktion und für die zellvermittelte Immunität von Bedeutung. Wird die kritische Temperatur unterschritten, versagt die Immunantwort (Anderson et al., 1979, Ellis, 1982). Weitere Faktoren sind die supressiven Mechanismen des endokrinen Systems in Stresssituationen (Ellis, 1982; Warren, 1983; Anderson et al., 1984).

Saisonale Schwankungen der Antikörperproduktion konnten bei Regenbogenforellen trotz gleichbleibender Umweltbedingungen demonstriert werden (Yamaguchi et al., 1980). Therapeutisch eingesetzte Antibiotika (Oxytetracycline) haben eine Minderung der Abwehrkapazität zur Folge (Anderson et al., 1984; van Muiswinkel et al., 1984). Im Falle der Vaccination beeinflussen Dosis und Inokulationsmodus des Antigens die Immunantwort. Auch die Art des Antigens (Partikulär, zellulär, molekulär) spielt eine Rolle (Ingram und Alexander, 1980; McCarthy et al., 1984).

Abbildung 1

Die Immunantwort der Regenbogenforelle nach "Flush Exposure" mit *Yersinia ruckeri* (Anderson et al., 1979).



Kinetik der Antikörper produzierenden Zellen ●—● und der zirkulierenden Antikörpertiter ○-○ nach "Flush Exposure" mit *Yersinia ruckeri*.

Vaccinierung

Die Immunisierung durch Injektion von *Yersinia ruckeri* führt in der Regel zu einem belastbaren Schutz, ist aber wirtschaftlich unrentabel. Methoden der oralen Immunisierung liefern keine befriedigenden Ergebnisse (Ellis, 1982; Johnson und Amend, 1983). Eine erfolgreiche Methode, die die Immunisierung großer Fischmengen erlaubt, ist das Tauchbad, wobei Setzlinge mit einem Mindestgewicht von 3 g, 30 Sekunden lang in eine inaktivierte *Yersinia ruckeri* Immersion getaucht werden. Eine einmalige Behandlung führt zu einem signifikanten Schutz, der durchschnittlich ein Jahr anhält (McCarthy und Johnson, 1982; Anderson et al., 1984; Moos und Jungbäck, 1986; Schlotfeldt et al., 1986).

III. Eigene Untersuchungen

1. Material

1.1 Bakterien

1.1.1 *Yersinia ruckeri* Feldisolat 300

1.1.2 *Yersinia ruckeri* Feldisolat 163

Die oben genannten Isolate wiesen die biologischen und biochemischen Eigenschaften des Serotyp I

(Hagerman) bzw. des Referenzstamms ATCC 29473 auf.

Die Feldisolate wurden auf Standardnährböden (Merck) bei 22°C gezüchtet und einmal pro Woche subkultiviert.

Tabelle 5

Eigenschaften der *Yersinia ruckeri* Isolate 163 und 300 nach api Bio Merieux 20 B

Gramfärbung: gram negativ		Beweglichkeit bei 25°C: pos.	
B-galactosidase	+	Glucose	+
Arginindihydrolase	-	Mannit	+
Lysindecaboxylase	-	Inosit	-
Ornithindecaboxylase	+	Sorbit	-
Citrat	-	Rhamnose	-
Urease	-	Saccharose	-
H ₂ S	-	Melibiose	-
Tryptophandesaminase	-	Amygdalin	-
Indol	-	Arabiose	-
Acetoin	-	Oxydase	-
Gelatinase	+		

1.2 Fische

Die untersuchten Fische stammten aus verschiedenen Fischzuchtanlagen im süddeutschen Raum der Bundesrepublik Deutschland oder aus natürlichen Gewässern Bayerns. Sie wurden dem Institut für Zoologie und Hydrobiologie der Universität München im Jahre 1986 zur Untersuchung zur Verfügung gestellt. Es wurden in dieser Arbeit 15 Fischarten (siehe Tabelle 6) serologisch und zum Teil pathologisch-anatomisch untersucht. Sowohl für den Vorversuch zur Bestimmung der Lethaldosis von *Yersinia ruckeri* als auch für den Infektionsversuch wurden Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) aus SPF-Haltung, mit einem Gewicht zwischen 40 und 150 Gramm bzw. einer Länge von 15 bis 23 Zentimetern, eingesetzt.

Tabelle 6

<u>Untersuchte Fischarten</u>	<u>Anzahl der Fische</u>
Regenbogenforelle (<i>Salmo gairdneri</i>)	267
Bachforelle (<i>Salmo trutta</i>)	74
Seeforelle (<i>Salmo trutta lacustris</i>)	3
Bachsaibling (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	19
Seesaibling (<i>Salvelinus alpinus</i>)	4
Coholachs (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	24
Königslachs (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>)	5
Äsche (<i>Thymallus thymallus</i>)	23
Aitel (<i>Leuciscus cephalus</i>)	7
Nase (<i>Chondrostoma nasus</i>)	5
Schleie (<i>Tinca tinca</i>)	5
Grasfisch (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	10
Karpfen (<i>Cyprinus carpio</i>)	17
Mühlkoppe (<i>Cottus gobio</i>)	2
Hecht (<i>Esox lucius</i>)	1
Summe der untersuchten Fische	466

1.3 Kaninchen

Zur Serumgewinnung wurden Kaninchen der Rasse "Weisse Neuseeländer", weiblich, ca. 6 Monate alt, herangezogen.

1.4 Seren

1.4.1 Fischseren

Zur serologischen Untersuchung auf Antikörper gegen Yersinia ruckeri wurden 454 Seren von 15 verschiedenen Fischarten analysiert. Die Fische stammten zum Teil aus Fischzuchtanlagen in Süddeutschland sowie zum Teil aus natürlichen Gewässern in Bayern (Königssee, Donau, Kronach). Alle Seren wurden bei minus 20°C aufbewahrt.

1.4.2 Kontrollseren

Als Kontrollseren wurden für die serologische Untersuchung folgende Seren verwendet:

1. Kaninchen-Normalserum
2. Kaninchen-Anti-Yersinia ruckeri-Serum Nr.9/163
3. Kaninchen-Anti-Yersinia ruckeri-Serum Ref. 1129 185-026 Rab.
Y.Ruckeri NFHRL 4/84
4. SPF-Fisch-Normalserum

Das Serum 3 wurde vom Eastern Fish Disease Laboratory, Leetown, West Virginia, U.S.A. zur Verfügung gestellt.

Die Seren 1,2 und 4 stammten aus eigener Herstellung.

1.5 Reagenzien

1.5.1 Sterile phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS)

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
KH ₂ HPO ₄	0,12 g
Na ₂ HPO ₄ (H ₂ O)	0,91 g

Die Lösung wurde im Autoklaven bei 134°C 15 Minuten sterilisiert und der pH-Wert auf 7,2 - 7,5 eingestellt.

1.5.2 Glycerinpuffer

Glycerin	8,0 ml
PBS (pH 7,5)	2,0 ml

Der Puffer wurde mit 1 N NaOH auf pH 8,5 eingestellt.

1.5.3 Aceton (2-Propanon)

1.5.4 Erythrozyten

Für die quantitative serologische Untersuchung mittels der indirekten Hämagglutination (IHA) wurde defibriniertes Schafsblut der Firma Oxoid FSR 1055 benutzt.

Folgende Chargen wurden eingesetzt:

1. 709 / S 240
2. 705 / S 99
3. 711 / S 375

Alle Reagenzien wurden bei 4°C - 6°C aufbewahrt, wobei die Erythrozyten stets frisch (d.h. maximal 5 Tage alt) verwendet wurden.

2. Methoden

2.1 Anzucht des Erregers

Da *Yersinia ruckeri* keine besonderen Ansprüche an das Nährmedium stellt, wurden die Ausstriche auf Standard-Nährböden (Merck) abgeimpft. Sie wurden 48 Stunden bei 22°C bebrütet. Zur Isolierung des Erregers wurden infizierte Fische durch MS 222(R) (Tricain Methan Sulfonat) in 0,007%-iger Lösung oder mittels Kopfschlag betäubt und anschliessend geschlachtet. Von den entnommenen Organproben (Niere, Milz, Leber) wurden unter sterilen Bedingungen mit einer Oese Abstriche von frischen Anschnittflächen auf Nährboden in Petrischalen vorgenommen und bebrütet.

Die angezüchteten Bakterien wurden zunächst im Nativ- und Gram-Präparat beurteilt und dann ihre biochemischen Eigenschaften sowie fluoreszenzserologisch untersucht.

2.2 Gewinnung der Fischseren

Alle Fische wurden mittels einer 0,007%-igen Tricain-Methan-Sulfonat-Lösung (MS 222) oder durch Kopfschlag betäubt, in Seitenlage auf eine feste rutschsichere Unterlage verbracht und dann mit einer sterilen Einmalspritze (5 ml) und einer sterilen Einmalkanüle (0,8 x 38 mm) durch Punktion der Schwanzvene entblutet. Zum Abseren wurde das gewonnene Blut 4 Stunden bei 4°C - 6°C stehen gelassen und anschliessend 10 Minuten bei 1600 x g zentrifugiert. Das Serum wurde in Eppendorff Gefäße pipettiert, gekennzeichnet und bei minus 20°C eingefroren.

2.3 Herstellung und Gewinnung von Immenserum vom Kaninchen

Um das Kontrollserum für die serologische Untersuchung der oben gewonnenen Fischseren herzustellen, wurde ein Kaninchen der Rasse "Weisser Neuseeländer" mit dem Feldisolat Nr. 163/12 immunisiert nachdem vorher eine Blutprobe zur Negativkontrolle entnommen wurde.

Die durch Hitze (2 Stunden im Wasserbad bei 90°C) inaktivierten Bakterien wurden 2 mal in PBS gewaschen. Dann wurde durch Resuspension in PBS eine Bakterienlösung mit einer Konzentration von $1,35 \times 10^{10}$ Keimen pro ml hergestellt.

0,5 ml dieser Bakteriensuspension wurden in die Ohrvene des Kaninchens injiziert.

Nach 14 Tagen wurde eine zweite Injektion in der gleichen Weise vorgenommen. 28 Tage nach dieser letzten Injektion wurde das Kaninchen in Narkose gelegt (0,65 ml Narcoren(R) = 16 g Pentobarbital pro ml i.v. in die Ohrvene) und durch Herzpunktion mit einer sterilen Kanüle (TSK-SUPRA mit Lanzettenschliff, 1,5 x 100 mm) völlig entblutet.

Zum Abseren wurde das Blut 4 Stunden bei 4-6°C stehen gelassen und anschliessend 10 Minuten bei 1600 x g zentrifugiert.

Das gewonnene Serum wurde dann bei minus 20°C eingefroren.

2.4 Indirekte Immunofluoreszenz (IFAT)

Die Indirekte Immunofluoreszenz wurde zur Identifizierung von *Yersinia ruckeri*, sowohl vom Organmaterial erkrankter Fische als auch von den angezüchteten Bakterien, herangezogen. Die Proben (Abklatsch bzw. Abstrich) wurden auf Objektträgern mit runden Testfeldern aufgetragen, luftgetrocknet und dann 10 Minuten in kaltem Aceton fixiert. Nach erneutem Lufttrocknen wurden sie gefärbt. Dabei diente eines der drei markierten Felder als Kontrolle, bei der Kaninchen-Normalserum verwendet wurde. Auf den Testfeldern wurde das Antigen mit

einigen Tropfen des Antiserums (Kaninchen-Anti-Yersinia-ruckeri-Serum H9/163) in einer Verdünnung von 1:40 in PBS überschichtet und 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Das nicht gebundene Serum wurde durch dreimaliges Waschen in PBS (je 5 Minuten lang) entfernt und das Präparat mit dem Fluorescein-Isothiocyant-markierten Anti-Kaninchen-Serum in 1:80iger Verdünnung bedeckt. Nach Inkubation in der feuchten Kammer (30 min bei Raumtemperatur) wurde überschüssige FHC-konjugierte Serum erneut durch dreimaliges Waschen in PBS entfernt. Danach wurden die Präparate in Glycerinpuffer (pH 8,5) eingebettet.

Die Auswertung erfolgte an einem Mikroskop Dialux 20 mit Fluoreszenzeinrichtung (Fluoreszenzauflichtilluminator Ploemopak 2,4. Das UV-Licht im Bereich von 380 nm wurde von einer Quecksilberhochdrucklampe erzeugt. Es wurden ein Wärmeschutz-, ein Erreger- und ein Sperrfilter verwendet. Mikroskopiert wurde mit Ölimmersion bei 63-facher und 10-facher Okular-Vergrößerung. Die Beurteilung erfolgte qualitativ-subjektiv. Die Bakterienzahl wurde mit + (einzelne Bakterien pro Gesichtsfeld), ++ (zählbare Bakterien pro Gesichtsfeld), +++ (massenhaft Bakterien pro Gesichtsfeld) angegeben. Ferner wurde die Qualität der Fluoreszenz mit + (schwach leuchtend), ++ (hell leuchtend) und +++ (brilliant leuchtend) bewertet. Unspezifische und Eigenfluoreszenzen des Hintergrundes wurden registriert. Es wurden Negativkontrollen mit Kaninchen-Normalserum durchgeführt.

2.5 Agglutination zum Nachweis von Serumantikörpern gegen Y.Ruckeri

2.5.1 Herstellung der Antigensuspension für die Agglutination

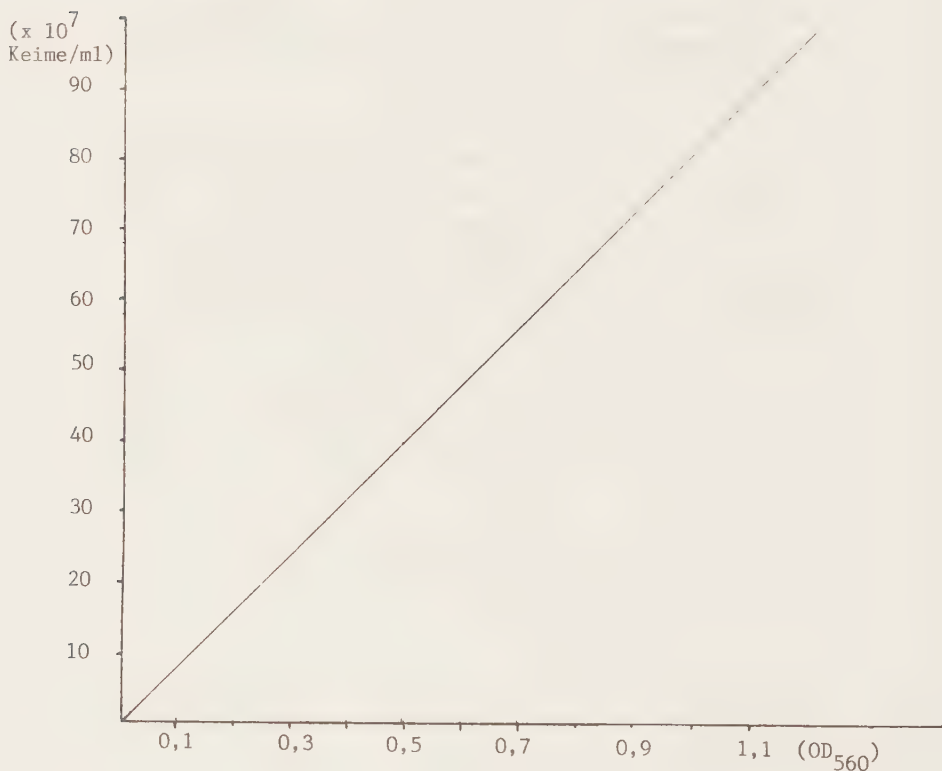
Bakterienmaterial einer 3 bis 4 Tage alten Kultur wurde mit einer sterilen Gese entnommen, in sterilem PBS suspendiert und 3 x in PBS gewaschen.

Die Suspension wurde photometrisch auf eine optische Dichte (OD)

von 1, bei 560 nm eingestellt. Bei einer OD = 1 bei 560 nm waren in einem ml Lösung $7,5 \times 10^8$ Keime enthalten.

Die Korrelation zwischen einer bestimmten optischen Dichte (OD) einer *Yersinia ruckeri*-Suspension bei einer Wellenlänge von 560 nm und der Keimzahl pro ml der Suspension wurde durch Verdünnungsreihen ermittelt und linear aufgetragen.

Abbildung 2



Der durch Zählung ermittelte Keimgehalt mehrerer *Yersinia ruckeri* Suspensionen (Y-Achse) wurde gegen die entsprechende photometrisch bestimmte optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 560 nm (X-Achse) aufgetragen.

2.5.2 Koppelung des Antigens an die Erythrozytenoberfläche

Die für den Versuch verwendeten Schafererythrozyten waren nicht älter als 5 Tage. Sie wurden drei Mal in PBS gewaschen bevor sie zu einer 10% igen Lösung suspendiert wurden.

Die Bakteriensuspension mit einer OD = 1, bei 560 nm, wurde eine Stunde im Wasserbad bei 90°C inaktiviert.

Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 10 ml dieser Suspension mit der gleichen Menge der 10% igen Erythrozytenlösung vermischt. Das so erhaltene Gemisch wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert und dann über Nacht (12 Stunden) bei 4-6°C stehengelassen.

Das ungebundene Antigen wurde durch dreimaliges Waschen in sterilem PBS entfernt und die gekoppelten Erythrozyten in PBS zu einer 1% igen Lösung suspendiert.

Eine 1% ige Kontrolllösung (ungekoppelte Schafererythrozyten) wurde analog hergestellt, um die mögliche Präsenz natürlich vorkommender, heterophiler Antikörper im Serum festzustellen, die ihrerseits eine Hämagglutination bewirken könnten.

2.5.3 Antikörpernachweis

Zu Versuchsbeginn wurden die frisch aufgetauten Fischseren bei 45°C und die Kaninchenserum bei 56°C im Wasserbad 20 bzw. 30 Minuten inaktiviert, auf Raumtemperatur abgekühlt und auf Antikörper gegen *Yersinia ruckeri* untersucht.

2.5.3.1 Die Objektträgerschnellmethode

25 µl des unverdünnten Serums und 25 µl der auf die optische Dichte (OD) = 1 bei 560 nm eingestellten, bekannten Antigen-suspension wurden zusammen auf einen Objektträger gegeben. Unter leichtem Schwenken des Objektträgers wurden die beiden Reagenzien, im positiven Fall, nach spätestens 5 Minuten bei Raumtemperatur zur Agglutination gebracht.

Die Agglutination wurde durch die Entstehung von " Körnern " mit bloßem Auge sichtbar. Diese Verklumpung der korpuskularen Elemente (Körner) beruhte auf der Anheftung von spezifischen Serumantikörpern an die hitzestabilen O-Antigene der Bakterienzellwände.

Um eine mögliche Autoagglutination auszuschliessen, wurden als Kontrolle 25 μ l des Serums mit 25 μ l PBS auf einen Objektträger gegeben und beurteilt.

Bewertet wurde stets mit bloßem Auge, bei diffusem Licht, vor dunklem Hintergrund. Die Reaktion wurde mit positiv, fraglich oder negativ angegeben.

2.5.3.2 Die Mikrotitermethode mittels der Indirekten Hamagglutination

Um eine qualitative Aussage über den Gehalt an spezifischen Serumantikörpern zu machen, wurde eine schrittweise Verdünnung des Serums vorgenommen und festgestellt, wann keine Agglutination mehr stattfand.

Da bei dieser Methode eine Agglutination, anders als bei der Objektträgermethode, nicht an sich schon durch die Entstehung von "Körnern" oder ähnlichem mit bloßem Auge zu sehen ist, wurde die Reaktion erkennbar gemacht, indem die Bakterien, bevor sie mit dem zu untersuchenden Serum zusammengegeben wurden, an Schaferythrozyten gebunden wurden. So war im Falle einer Antigen-Antikörper-Reaktion das "Bild einer Hamagglutination" zu sehen.

Es wurden Serumverdünnungen bis zu 1:256 in einer Mikrotiterplatte mit Rundböden (Titertek (R)) mit dem bekannten Antigen beschickt.

Zunächst wurden in jedes Reaktionskompartiment der Rundbodenplatte 25 μ l steriles PBS vorgelegt. Die Kompartimente der Reihe A (erste Reihe) wurden dann mit 25 μ l der zu untersuchenden Seren beschickt. Pro Serum wurde ein Doppelansatz gemacht. Mit Mikrodilutern wurden die Seren durchverdünnt. Anschliessend wurden den Kompartimenten der Reihe A je 25 μ l

einer 1%-igen Kontroll-Erythrozyten-Suspension (unbeladene Erythrozyten) zugegeben, während die Kompartimente der Reihen B bis H mit jeweils 25 µl der beladenen Erythrozyten beschickt wurden.

Die Platten wurden dann eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurden sie 20 Stunden bei 4-6°C stehengelassen bevor sie ausgewertet wurden.

Der Antikörpertiter wurde als reziproker Wert der Serumverdünnung angegeben, bei der noch eine Reaktion stattfand.

Eine Bildung von sogenannten Erythrozytenknöpfen am Boden der Kompartimente zeigte eine negative Reaktion an.

Die Serumkontrollen durften keine Hämagglutination aufweisen. Abgelesen wurde mit bloßem Auge, bei diffusem Licht vor hellem Hintergrund. Titer ab 1:4 wurden notiert.

3. Infektionsversuche

Um die Virulenz der eingesetzten *Yersinia ruckeri* Isolate zu testen und um ERM positives Vergleichsmaterial (Organe, Serum) zu erhalten, wurde ein Infektionsversuch an Regenbogenforellen durchgeführt. Zur Ermittlung der Letaldosis von unseren Isolaten war ein Vorversuch nötig, wobei vergleichbare Versuchsfische mit jeweils verschiedenen Antigenkonzentrationen infiziert wurden.

3.1 Versuchsbedingungen

Die Regenbogenforellen, aus SPF-Haltung, 20-40 cm lang und 40-220 g schwer, wurden ca. 1 Woche vor Versuchsbeginn in 120 l fassende, gut durchlüftete Glasaquarien verbracht, um sich zu aklimatisieren.

Zur Wasserversorgung wurde Münchner Leitungswasser mit einem Härtegrad von 16,4 dH und einer Temperatur von 12°C, verwendet. Die Aquarien wurden im Durchflußsystem (2 l/min) mit dem vorher entchlorten Wasser gespeist.

Die Fütterung der Fische erfolgte mit handelsüblichem, pelletiertem Regenbogenforellenalleinfutter ad libitum.

3.2 Inokulation der Versuchstiere

Entsprechend 2.3.1, wurden 3-4 Tage alte Bakterienkulturen in sterilem PBS suspendiert und die jeweiligen Gebrauchsdosen eingestellt.

Die nüchternen Fische wurden mit einer 0,007%-igen MS 222(R) Badelösung betäubt, mit 0,1 ml der jeweiligen Bakteriensuspension s.c. seitlich der Rückenflosse injiziert, und an den Schwanzflossen durch einen Scherenschlag markiert.

Die Kontrollfische wurden analog mit reinem PBS gespritzt.

3.3 Versuchsansätze

3.3.1 Erster Versuch als Dosistest

Fische : 8 SPF-Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) mit einem Gewicht zwischen 40 und 120 g und einer Länge von 15-20 cm

Antigen: *Yersinia ruckeri* Feldisolat 300/10

Dosis A: 0,1 ml pro Fisch einer Suspension mit 5×10^6 Keimen pro ml

Dosis B: 0,1 ml pro Fisch einer Suspension mit 5×10^5 Keimen pro ml

Jeweils 3 Tiere wurden mit der Dosis A und je 3 Tiere mit der Dosis B beimpft.

Die 2 Kontrollfische wurden separat gehalten.

3.3.2 Zweiter Versuch als Dosistest

Fische : 8 SPF-Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) mit einem Gewicht zwischen 80 und 150 g und einer Länge von 19-25 cm

Antigen: *Yersinia ruckeri* Feldisolat 163/13

Dosis A: 0,1 ml pro Fisch einer Suspension mit $3,5 \times 10^6$
Keimen pro ml

Dosis B: 0,1 ml pro Fisch einer Suspension mit $3,5 \times 10^5$
Keimen pro ml

Jeweils 3 Forellen wurden mit der Dosis A und je 3
mit der Dosis B beimpft.

Die 2 Kontrollfische wurden separat gehalten.

3.3.3 Infektionsversuch

Fische : 12 SPF-Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) mit
einem Gewicht zwischen 85 und 140 g und einer
Länge von 19-24 cm

Antigen: *Yersinia ruckeri* Feldisolat 163/16

Dosis : 0,1 ml pro Fisch einer Suspension mit $3,5 \times 10^5$
Keimen pro ml

8 der Versuchstiere wurden mit der o.g. Dosis infiziert.

Die 4 Kontrollfische wurden separat gehalten.

Während der 3 Versuche wurden alle Tiere täglich begutachtet. Eventuelle Verhaltensstörungen und äußerliche Veränderungen bzw. Krankheitssymptome wurden notiert. Wenn die Symptome sehr drastisch waren, wurden die betroffenen Fische mit MS 222(R) betäubt und zwecks Serumgewinnung entblutet. Von den Organen (Niere, Leber, Milz) wurden unter sterilen Bedingungen Proben zur Anzucht und zur Immunofluoreszenz entnommen, nachdem die pathologisch-anatomischen Befunde erhoben wurden.

Von akut gestorbenen Fischen wurden die Befunde erhoben und entsprechende Organproben zur Erregeranzucht entnommen.

Nach Ende des Versuchs wurden alle Kontrollfische ebenfalls mit MS 222(R) betäubt und zwecks Serumgewinnung entblutet.

Mit den Organen wurde wie oben vorgegangen.

4. Ergebnisse

4.1 Infektionsversuche

4.1.1 Vorversuche

Aus dem ersten Versuch geht hervor, daß die Dosis A von 5×10^5 Bakterien pro 0,1 ml des Isolats 300/10 zu einem akuten bis perakuten Krankheitsverlauf mit baldigem Tod führt.

Die Tiere, die mit der niedrigeren Dosis B von 5×10^4 Bakterien pro 0,1 ml Suspension inokuliert wurden, erkrankten in der Regel nach 10 - 14 Tagen. Zwei der drei Forellen zeigten deutliche Krankheitssymptome, während eine Regenbogenforelle kaum Anzeichen einer Erkrankung aufwies.

Der im zweiten Versuch eingesetzte Stamm 163/16 weist eine ähnliche Virulenz wie der im ersten Versuch verimpfte Stamm (300/10) auf.

Die Forellen, die die Dosis A von $3,5 \times 10^5$ Keimen pro 0,1 ml erhielten, erkrankten ebenfalls perakut, während die Tiere, die mit der niedrigeren Dosis B von $3,5 \times 10^4$ Keimen pro 0,1 ml beimpft wurden, erste Erscheinungen nach 12-16 Tagen zeigten. In allen Fällen war der Erregernachweis aus den Organen (Niere, Leber, Milz, Darm) positiv. Die serologische Untersuchung am 20. Tag p.i. erbrachte unterschiedliche Ergebnisse (Titer von 0 bis 64).

Die Kontrollfische wurden am 40. Tag p.i. untersucht. Sie waren klinisch gesund und wiesen keine Antikörper gegen *Yersinia ruckeri* auf.

4.1.2 Infektionsversuch

Mit Ausnahme einer Forelle, waren die Fische bis zum 20. Tag post infectionem klinisch gesund. Nach der Blutentnahme am 20. Tag p.i. zeigten 4 der 8 Regenbogenforellen zunehmend deutliche, aber unspezifische Krankheitssymptome.

2 der 8 Fische sind vor Versuchsende verendet (siehe Tabelle 7). Am 30. Tag nach der Infektion wurden die Forellen betäubt, wenn möglich entblutet, und es wurden Organproben zur Erregeranzucht entnommen.

Der Erregernachweis war in allen Fällen positiv, während die serologische Untersuchung unterschiedliche Ergebnisse erbrachte (Titer von 0 bis 128).

Die Kontrollfische waren am 40. Tag p.i. klinisch gesund und wiesen keine Antikörper gegen *Yersinia ruckeri* auf. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Fische, die mit der höheren Dosis des Antigens konfrontiert wurden, perakut bis akut erkrankten und äußerlich sowie innerlich typische Veränderungen aufwiesen.

Bei den Fischen, die mit der niedrigeren Dosis konfrontiert wurden, war der Verlauf der Krankheit chronisch bis inapparent. Die äußerlichen und innerlichen Veränderungen waren weniger auffällig und meist unspezifisch.

Von allen Fischen konnte aus den entnommenen Organproben der Erregernachweis durch Anzucht geführt werden.

Tabelle 7

Ergebnisse aus dem Infektionsversuch mit dem Feldisolat 163/16

Fisch	Verlauf d.Krankheit in Tagen p.i.	Sektionsbefund	Erregernachweis	Serologic	
				OA	IHA(TITE)
RF 1) 85 g 19 cm	14. Tag: verzögerter Fluchtreflex 20. Tag: Dunkelfärb. d. Haut 26. Tag: a.d. Wasseroberfläche nach Luft schnappend 29. Tag: verendet	Schwellung d. parenchm. Organe; Aszites Magen-Darm: leer Schwellung d. Darm-schleimhaut	Niere: positiv Leber: positiv Darm : positiv	20. Tag positiv	64
RF 2) 100 g 20 cm	20. Tag: verzögerter Fluchtreflex Dunkelfärb. d. Haut 27. Tag: Gleichgewichtsstörungen a.d. Wasseroberfläche nach Luft schnappend 28. Tag: verendet	petechiale Blutungen a. Flossenbasen und i. d. Maulhöhle; Blut:matt u. wässrig; Schwellung d. Darmschleimhaut katarrhal. Enteritis	Niere: positiv Leber: positiv Darm : positiv	20. Tag positiv	16
RF 3) 110 g 21 cm	20. Tag: verzögerter Fluchtreflex 30. Tag: lethargisch a.d. Wasseroberfläche schwimmend Tötung	äußerlich: o.b.B. Schwellung d. parenchm. Organe; magen-Darm:leer	Niere: positiv Leber: positiv Darm : positiv	20. Tag negativ 30. Tag negativ	0 0
RF 4) 120 g 21 cm	26. Tag: verzögerter Fluchtreflex Dunkelfärbung d. Haut 30. Tag: Tötung	Schwellung d. parenchm. Organe; Hämatom im Bereich d. Punktionsstelle	Niere: positiv Leber: positiv Darm : positiv	20. Tag positiv	128
RF 5) 120 g 21,5 cm	22. Tag: verzögerter Fluchtreflex 30. Tag: a.d. Wasseroberfläche schwimmend; Tötung	äußerlich: o.b.B. Blut: matt u. wässrig	Niere: positiv Leber: positiv Darm : positiv	20. Tag positiv	8
RF 6) 130 g 22cm	22. Tag: verzögerter Fluchtreflex 30. Tag: Tötung	äußerlich: o.b.B. katarrhal. Enteritis	Niere: positiv Leber: positiv Darm : positiv	20. Tag positiv 30. Tag positiv	8 16
RF 7) 140 g 23,5 cm	22. Tag: verzögerter Fluchtreflex 30. Tag: Tötung	äußerlich: o.b.B. Schwellung d. parenchm. Organe; katarrhalische Enteritis	Niere: positiv Leber: positiv Darm : positiv	20. Tag positiv 30. Tag positiv	unspcz. unspcz.
RF 8) 140 g 24 cm	22. Tag: verzögerter Fluchtreflex 30. Tag: Tötung	äußerlich o.b.B. petechiale Blutungen d. serosen Häute von Leber u. Schwimmblase katarrhal. Enteritis	Niere: positiv Leber: positiv Darm : positiv	20. Tag negativ 30. Tag negativ	0 0

RF : Regenbogenforelle

OA : Objektträgeragglutination; Serum unverdünnt

IHA: Indirekte Hämagglutination; höchste Titerstufe

4.2 Serologische Untersuchungsergebnisse

Es wurden insgesamt 466 Seren der Jahre 1984, 1985 und 1986 von 15 verschiedenen Fischarten serologisch auf Antikörper gegen *Yersinia ruckeri* untersucht.

Die Ergebnisse sind für jedes Jahr gesondert tabellarisch (siehe Tabellen 8 bis 16) zusammengefaßt.

Die Salmoniden sind von den Nicht-Salmoniden getrennt, und in der Gruppe der Salmoniden ist die Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*), als wichtigster Vertreter in der Teichwirtschaft, gesondert aufgeführt.

Während der Untersuchung oben aufgeführter Seren, wurde regelmäßig als Kontrolle das Regenbogenforellen-Normalserum sowie das Kaninchen-Anti-*Yersinia ruckeri*-Serum mit getestet.

Für das Regenbogenforellen-Normalserum erbrachten die Objektträgeragglutination und die Indirekte Hämagglutination in der Mikrotiterplatte stets negative Ergebnisse.

Für das Kaninchen-Anti-*Yersinia ruckeri*-Serum erbrachte die Objektträgeragglutination stets eine positive Reaktion. In der Indirekten Hämagglutination ergab sich, außer in einem Ansatz, in dem sich ein Titer von 256 ergab, stets ein Titer von 512.

Abbildung 3: Einteilung der Mikrotitrierplatte für die Indirekte Hämagglutination

	Serum NR. 1		Serum NR. 2		Serum NR. 3		Serum NR. 4		Kaninchen- Serum		Fisch-Normal- Serum	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Verdünnungsstufen →

1:2

1:4

1:8

1:16

1:32

1:64

1:128

1:256

Testserum NR. 1: Keine Antikörper gegen Yersinia ruckeri
 Testserum NR. 2: Antikörper gegen Yersinia ruckeri, Titer: 16
 Testserum NR. 3: unspezifische Reaktion, nicht aussagekräftig
 Testserum NR. 4: unspezifische Reaktion, nicht aussagekräftig
 Kaninchen-Serum: Kaninchen-Anti-Yersinia ruckeri-Serum, Titer: 256
 Fisch-Normal-Serum: keine Reaktion

Tabelle 8: Serologische Untersuchungsergebnisse von 90 Regenbogenforellen, 1984

Herkunft	Zahl d. Proben	sonstige Befunde	OA			IHA		
			neg.	fragl.	pos.	neg.	unspec.	pos. (Titer)
Fischzucht 1	4	Furunkulose	4	0	0	4	0	0
Fischzucht 1	26	o.b.B.	22	3	1	23	1	2(4), (16)
Fischzucht 2	10	BKD	9	1	0	10	0	0
Fließgewässer (Alz)	2	o.b.B.	1	1	0	2	0	0
Fließgewässer (Grümpel)	1	BKD	1	0	0	1	0	0
Fischzucht 3	10	BKD	10	0	0	10	0	0
Fließgewässer (Kronach)	1	o.b.B.	0	1	0	0	0	1(4)
Fischzucht 2	10	o.b.B.	8	1	1	8	0	2(4), (32)
Fischzucht 4	26	o.b.B.	24	1	1	24	1	1(8)
Gesamtzahl	90		79	8	3	82	2	6

Tabelle 9: Serologische Untersuchungsergebnisse von 100 Regenbogenforellen, 1985

Herkunft	Zahl d.Proben	sonstige Befunde	OA			IHA		
			neg.	fragl.	pos.	neg.	unspez.	pos. (Titer)
Fischzucht 6	24	BKD-Verdacht, o.b.B.	21	2	1	21	2	1(64)
Fischzucht 7	17	o.b.B.	13	2	2	15	1	1(8)
Fließgewässer (Donau)	10	o.b.B.	7	1	2	8	1	1(16)
Fischzucht 8	1	BKD	1	0	0	1	0	0
Fischzucht 7	17	o.b.B.	16	0	1	16	0	1(8)
Fischzucht 2	2	BKD	2	0	0	2	0	0
Fischzucht 9	9	o.b.B.	8	0	1	8	0	1(8)
Fließgewässer (Altkanal)	1	o.b.B.	1	0	0	1	0	0
Fischzucht 9	19	Aeromonas spez.	17	2	0	16	2	1(4)

Gesamtzahl

100

85

7

8

87

7

6

Tabelle 10: Serologische Untersuchungsergebnisse von 77 Regenbogenforellen, 1986

Herkunft	Zahl	sonstige Befunde	OA				IHA	
			d.Proben		neg. fragl.		pos. neg. unspez.	pos.(Titer)
Fischzucht 13	18	o.b.B.	12	4	2	13	2	3(4), (16), (16)
Fischzucht 2	12	o.b.B.	10	2	0	12	0	0
Fischzucht 1	15	o.b.B.	12	1	2	13	1	1(8)
Fischzucht 14	5	o.b.B.	5	0	0	4	1	0
Fischzucht 15	3	o.b.B.	3	0	0	3	0	0
Fischzucht 4	20	o.b.B.	16	1	3	15	2	3(8), (8), (8)
Fließgewässer (Iller)	4	o.b.B.	4	0	0	4	0	0
Gesamtzahl	77		62	8	7	64	6	7

Tabelle 11: Serologische Untersuchungsergebnisse von 73 sonstigen Salmoniden, 1984

Herkunft	Zahl d.Proben		sonstige Befunde		Tierart	OA				IHA	
						neg. fragl.	pos.	neg.	unspec.	pos.	(Titer)
Fischzucht 1	3	Furunkulose			Bachforelle	3	0	0	3	0	0
Fließgewässer (Grümpel)	5	o.b.B.			Bachforelle	5	0	0	5	0	0
Fließgewässer (Kronach)	9	o.b.B.			Bachforelle	8	1	0	9	0	0
Fließgewässer (Pegnitz)	5	o.b.B.			Bachforelle	5	0	0	5	0	0
Fließgewässer (Wilde Rodach)	6	o.b.B.			Bachforelle	6	0	0	6	0	0
Fischzucht 2	12	Shigella faecalis			Bachforelle	10	1	1	9	2	1(8)
Fischzucht 1	9	o.b.B.			Bachforelle	9	0	0	9	0	0
Fischzucht 13	1	o.b.B.			Seeforelle	1	0	0	1	0	0
Fischzucht 2	5	kont. Ausfälle			Königsalachs	4	0	1	4	0	1(8)
Fischzucht 5	18	o.b.B.			Coholachs	16	1	1	17	0	1(16)
Gesamtzahl	73					67	3	3	68	2	3

Tabelle 12: Serologische Untersuchungsergebnisse von 12 sonstigen Salmoniden, 1985

Herkunft	Zahl d. Proben	sonstige Befunde	Tierart	OA				IHA	
				neg.	fragl.	pos.	neg.	unspec.	pos. (Titer)
Fischzucht 8	1	BKD	Bachforelle	1	0	0	0	1	0
Fischzucht 1	10	o.b.B.	Bachforelle	9	1	0	10	0	0
Fischzucht 10	1	o.b.B.	Bachsabl.ing	1	0	0	1	0	0
Gesamtzahl	12			11	1	0	11	1	0

Tabelle 13: Serologische Untersuchungsergebnisse von 67 sonstigen Salmoniden, 1986

Herkunft	Zahl d.Proben	sonstige Befunde	Tierart	OA				IHA		
				neg.	fragl.	pos.	neg.	unspec.	pos.	(Titer)
Fischzucht 16	10	o.b.B.	Bachsaiibling	8	1	1	9	1	0	
Fischzucht 2	2	BKD	Bachsaiibling	2	0	0	2	0	0	
Fließgewässer (im Bay. Wald)	6	o.b.B.	Bachsaiibling	6	0	0	6	0	0	
Fischzucht 13	4	o.b.B.	Seesaiibling	4	0	0	4	0	0	
Fischzucht 2	2	o.b.B.	Seeforelle	2	0	0	2	0	0	
Fischzucht 13	6	o.b.B.	Coholachs	6	0	0	6	0	0	
Fischzucht 13	10	o.b.B.	Bachforelle	8	0	2	8	0	2(8), (16)	
Fließgewässer (Pegnitz)	4	o.b.B.	Bachforelle	3	1	0	3	1	0	
Fließgewässer (Schutter)	2	o.b.B.	Äsche	2	0	0	2	0	0	
Fischzucht 1	10	o.b.B.	Äsche	9	1	0	9	0	1(4)	
Fischzucht 13	6	petech. Blutungen	Äsche	6	0	0	6	0	0	
Fließgewässer (Iller)	5	Aeromonas hydroph.	Äsche	5	0	0	5	0	0	
Gesamtzahl	67			61	3	3	62	2	3	

Tabelle 14: Serologische Untersuchungsergebnisse von 13 Nicht-Salmoniden, 1984

Herkunft	Zahl		sonstige Befunde	Tierart	OA		IHA			
	d.Proben				neg.	fragl. pos.	neg.	unspez. pos. (Titer)		
Fischzucht 2	7	o.b.B.		Aitel	7	0	0	7	0	0
Fischzucht 4	5	Ektoparasiten		Karpfen	5	0	0	5	0	0
Fischzucht 2	1	Hautgeschwüre		Karpfen	1	0	0	1	0	0
Gesamtzahl	13				13	0	0	13	0	0

Tabelle 15: Serologischen Untersuchungsergebnisse von 17 Nicht-Salmoniden, 1985

Herkunft	Zahl		Tierart	OA				IHA	
	d.Proben	sonstige Befunde		neg.	fragl.	pos.	neg.	unspez.	pos.(Titer)
Fischzucht 11	4	Ektoparasiten	Karpfen	3	1	0	2	1	1(4)
Fließgewässer (Donau)	1	o.b.B.	Hecht	0	0	1	0	0	1(4)
Fischzucht 12	2	Ektoparasiten	Grasfisch	2	0	0	2	0	0
Fließgewässer (Donau)	5	o.b.B.	Schleie	5	0	0	5	0	0
Fließgewässer (Donau)	5	o.b.B.	Nase	5	0	0	5	0	0

Gesamtzahl	17		15	1	1	13	2	2
------------	----	--	----	---	---	----	---	---

Tabelle 16

Die serologischen Untersuchungsergebnisse von 17 Nicht-Salmoniden, 1986

Herkunft	Zahl d.Proben	sonstige Befunde Tierart	OA		IHA	
			neg. fragl.	pos.	neg. unspez. pos. (Titer)	
Fischzucht 2	8	Ektoparasiten Grasfisch	7	0 1	7	0 1(8)
Fischzucht 17	7	o.b.B. Karpfen	7	0 0	7	0 0
Natürl. Gewässer (Königssee)	2	o.b.B. Mühlkoppe	2	0 0	2	0 0
Gesamtzahl	17		16	0 1	16	0 1

OA : Objektträgeragglutination; Serum unverdünnt

IHA: Indirekte Hämagglutination; höchste Titerstufe

Tabelle 17

Übersicht aller untersuchten Fischseren aus den Jahren 1984, 1985 und 1986

	Regenbogenforelle	Sonstige Salmoniden	Nicht-Salmoniden
Zahl d. Fische	267	152	47
Objektträger- agglutination:	pos. 18 (6,7%) fragl. 23 (8,6%) neg. 226 (84,6%)	6 (3,9%) 6 (3,9%) 140 (92,1%)	3 (6,4%) 1 (2,1%) 43 (91,5%)
Indirekte Hämagglu- tination:	pos. 19 (7,1%) unspez. 15 (4,9%) neg. 233 (88,7%)	6 (4,0%) 4 (2,4%) 142 (93,4%)	3 (6,4%) 2 (4,3%) 42 (89,3%)

1
8
5
1

4.3 Vergleich der Objektträgeragglutination und der Indirekten
Hämagglutination in der Mikrotiterplatte

Von sämtlichen 466 untersuchten Seren reagierten in beiden Tests übereinstimmend 403 Seren negativ und 22 Seren positiv. In 91,2% der untersuchten Seren stimmten die Ergebnisse der OA mit denen der IHA überein.

Regenbogenforelle

	positiv	negativ
Objektträgeragglutination	18	226
Indirekte Hämagglutination	19	233

235 (88 %) der 267 Seren reagierten übereinstimmend.

Sonstige Salmoniden

	positiv	negativ
Objektträgeragglutination	6	140
Indirekte Hämagglutination	6	142

142 (93,4%) der 152 Seren reagierten übereinstimmend.

Nichtsalmoniden

	positiv	negativ
Objektträgeragglutination	3	43
Indirekte Hämagglutination	3	42

44 (93,6%) der 47 Seren reagierten übereinstimmend.

IV. Diskussion

Agglutinierende Antikörper gegen *Yersinia ruckeri* wurden in der vorliegenden Arbeit mittels zweier serologischer Nachweisverfahren, der Objektträgeragglutination und der Indirekten Hämagglutination, in den Seren von 8 verschiedenen Fischarten nachgewiesen.

Das eingesetzte *Yersinia ruckeri*-Feldisolat (163/16) wies die biologischen und biochemischen Eigenschaften des Serotyp I (Hagermann strain) auf und reagierte spezifisch mit dem Serotyp I-Antiserum (REF. 1129 185-026 Rab. *Y. ruckeri* NFHRL 4/84).

Nachdem Kreuzreaktionen der verschiedenen Serotypen nicht zu erwarten sind (McCarthy und Johnson, 1982; Stevenson und Airdrie, 1984) und der Serotyp I allgemein als der bedeutendste und am häufigsten isolierte Typ gilt (Bullock et al., 1978; McCarthy und Johnson, 1982; Austin und Austin, 1987), können die in dieser Arbeit nachgewiesenen Antikörper ebenfalls als Serotyp I-Antikörper interpretiert werden.

Die Objektträgeragglutination diente als qualitativer "Screening Test". Die IHA in der Mikrotiterplatte sollte die OA bestätigen und eine qualitative sowie eine quantitative Aussage über die Antikörper gegen *Yersinia ruckeri* ermöglichen. Es wurden insgesamt 466 Seren mit beiden Methoden untersucht. 425 Seren (91,2%) erbrachten in der OA und IHA einheitliche Ergebnisse: 403 Seren reagierten negativ und 22 Seren reagierten positiv.

Es wurden Agglutinationstiter von 4 bis 64 ermittelt.

In 4 Fällen erbrachte die IHA positive Ergebnisse, obwohl die OA negativ ausfiel. Alle 4 Seren wiesen einen Titer von 4 auf. Dieses Ergebnis stimmt mit der Erkenntnis von Hansen und Lingg (1976) insofern überein, als daß die IHA auf kleinere Mengen von Antikörpern im Serum reagiert als die OA.

Folglich wurden alle Seren, die in der IHA einen Titer ab 4

aufwiesen, als positiv beurteilt, auch wenn sie in der OA keine positive Reaktion zeigten.

In 5 Fällen reagierten die Seren in der OA positiv, während in der IHA die Kontrollerythrozyten lysiert wurden (unspez. Reaktion). Diese Ergebnisse sind nicht auswertbar, da im Serum befindliche natürliche Hämolsine oder heterophile im Serum befindliche Antikörper durch Hämolyse nicht gekoppelter Erythrozyten die mögliche Präsenz von Antikörpern gegen *Yersinia ruckeri* in der IHA überdecken könnten.

Bei Regenbogenforellen wurden Agglutinationstiter von 4 bis 64 festgestellt. Von den 267 Regenbogenforellensereren wiesen 19 Seren (7,1%) Antikörper gegen *Yersinia ruckeri* auf. Titer von 8 bis 16 wurden bei 3 (4,1%) von 74 Bachforellen sowie bei 3 (3,9%) von 78 sonstigen Salmoniden ermittelt. Auch 3 (6,4%) von 47 Nichtsalmoniden wiesen Titer auf.

In den Infektionsversuchen stimmten die Ergebnisse der Objektträgeragglutination mit denen der Indirekten Hämagglutination in der Mikrotiterplatte überein. Als niedrigste Titerstufe wurde 4 und als höchste Titerstufe 128 ermittelt.

Einen Unterschied in der Agglutinationsreaktion zwischen der Bachforelle (*Salmo trutta*) und der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*) wie im Falle der BKD (Schauner 1986), konnte nicht festgestellt werden.

Beide serologische Nachweisverfahren, bei denen spezifisch Antikörper gegen *Yersinia ruckeri* nachgewiesen wurden, lieferten sowohl in den Feld- als auch in den Infektionsversuchen gute Ergebnisse, auch wenn die Reaktionen auf dem Objektträger nicht so ausgeprägt, und die ermittelten Titer in der IHA nicht so hoch waren, wie im Falle der Kaninchen-Anti-*Yersinia ruckeri*-Seren.

Die IHA in der Mikrotiterplatte reagierte empfindlicher als die Objektträgeragglutination. Sie ist aber aufgrund des relativ hohen Aufwands nicht überall einsetzbar und benötigt zur Ausführung gewisse Laborkenntnisse und entsprechende Einrichtungen. Dagegen ist die Durchführung der OA wesentlich einfacher und schneller zu handhaben. Ihre Spezifität entspricht zwar in etwa der der IHA, aber wie erwähnt, reagiert sie nicht so empfindlich wie diese. Daher sollte bei kritischen Fällen stets die IHA mit herangezogen werden.

Der erste Fall von Rotmaulseuche in der BRD wurde im August 1981 in Niedersachsen beobachtet (Fuhrmann et al. 1983), nachdem bereits im März des gleichen Jahres die Krankheit in einer Fischzucht in Südwestfrankreich ausgebrochen war (Lesel et al., 1983).

Bis dahin schien sie auf den nordamerikanischen Kontinent und Australien begrenzt (Bullock et al., 1977).

In den Jahren 1984/85 wurden bereits in Nordwestdeutschland 40 bakteriologisch gesicherte Ausbrüche registriert (Schlotfeldt et al. 1985). In Südbaden wurden im Sommer 1984 mehrere Fälle von ERM beobachtet (Rübsamen und Weis, 1985). Auch in unserem Erfassungsgebiet (östliches Süddeutschland) ist der Erreger der Rotmaulseuche aufgetreten:

1984 wiesen 6,7% der untersuchten Regenbogenforellen und 4,1% sonstiger Salmoniden positive Titer gegen *Yersinia ruckeri* auf. Auch im Jahr 1985 waren 6% der untersuchten Regenbogenforellen positiv, während keine der 12 sonstigen Salmoniden einen Titer gegen *Yersinia ruckeri* aufwiesen. Im Jahr 1986 stieg die Zahl der positiven Reagenten innerhalb der Regenbogenforellenpopulation auf 9,1%, während die Zahl der positiven Fälle bei den anderen Salmoniden bei 4,5% lag.

Diese Untersuchung bestätigt die Ergebnisse von Rübsamen und Weis (1985) insofern, als sich der Erreger der Rotmaulseuche bei den Regenbogenforellen in Deutschland weiter ausgebreitet hat, bzw. daß die Durchseuchung in unserem Unter-

suchungsgebiet von 1984-1986 zugenommen hat, obwohl von seuchenhaften ERM-Ausbrüchen wenig Konkretes bekannt ist. Das mag daran liegen, daß es sich bei der ERM um keine meldepflichtige Krankheit handelt, oder daß sie mit Krankheiten anderer Ätiologie verwechselt wurde und durch medikamentelle Gegenmaßnahmen soweit eingedämmt werden konnte, daß auf anschließende bakteriologische bzw. serologische Untersuchungen verzichtet wurde.

Da die große Mehrzahl der untersuchten Fische aus Fischzuchtanlagen stammten, kann über den Durchseuchungsgrad bei freilebenden Fischen keine Aussage getroffen werden. Positive Reagenten wurden in 9 von 17 untersuchten Fischzuchtbetrieben ermittelt. Von 2 Betrieben wurden jeweils in den Jahren 1984 und 1986 Serumproben untersucht. Beide Betriebe wiesen sowohl 1984 als auch 1986 positive Reagenten auf.

Dieser Befund wäre folgendermaßen zu erklären: Beide Betriebe wurden 1984 oder früher mit dem Erreger der Rotmaulseuche konfrontiert. Entweder sind die zirkulierenden Antikörper zwei Jahre nach einmaliger Infektion immer noch nachweisbar gewesen - Anderson et al. (1979) konnten über ein Jahr nach Immunisierung von Regenbogenforellen mit *Yersinia ruckeri* die spezifischen Antikörper nachweisen - oder es fand in den Betrieben eine regelmäßige Reinfektion ohne klinische Ausbrüche statt, die jedesmal erneut die Produktion von Antikörpern zur Folge hatte. Letzteres scheint plausibel und bekräftigt die Auffassung von Hansen und Lingg (1976), daß klinisch inapparent infizierte Fische (Carrier) oder andere Erregerreservoirare (Rucker, 1966) das Persistieren des Erregers innerhalb eines Bestandes und somit seine kontinuierliche Verbreitung ermöglichen.

Daß freilebende Fische den Erreger beherbergen bzw. sich zumindest mit ihm auseinandergesetzt haben, geht aus den serologischen Untersuchungen hervor: Es wurden Antikörper gegen *Yersinia ruckeri* in den Seren von 2 Regenbogenforellen und einem Hecht, aus natürlichen Gewässern stammend, gefunden.

Schlotfeldt et al. (1985) konnten auch beim Hecht (*Esox lucius*) das Bakterium isolieren. Die vorliegenden Befunde zeigen, daß diese Spezies sich offensichtlich mit *Yersinia ruckeri* auseinandersetzt. Über Ausbrüche der Krankheit bei freilebenden Wildfischen gibt es keine Berichte (Warren, 1983). Erst wenn die Fische unter unnatürlichen Bedingungen gehalten werden und mit einer großen Anzahl der Erreger konfrontiert werden, kommt es zu ERM-Epidemien (Ross et al., 1966).

Hunter et al. (1980) demonstrierten, daß Carrier den Erreger nur dann in großen Mengen ausscheiden bzw. daß Empfängerfische nur dann erkranken, wenn sie gestreßt werden.

Aus diesen Überlegungen heraus muß gefolgert werden, daß die Rotmaulseuche zu den Faktorenkrankheiten zu zählen ist, *Yersinia ruckeri* also ein fakultativ pathogener Keim ist.

Von Bedeutung ist die Tatsache, daß unter den in dieser Arbeit untersuchten Nichtsalmoniden positive Reagenten ermittelt wurden.

Somit konnte die Auffassung anderer Autoren bestätigt werden, daß klinisch inapparent infizierte Nichtsalmoniden, denen man bis vor kurzem keine besondere Bedeutung in der Epizootologie der Yersiniose beigemessen hat, als Erregerreservoir und somit als Infektionsquelle in Frage kommend einen wesentlichen Faktor darstellen, den es in der Bekämpfung der Rotmaulseuche zu berücksichtigen gilt (Wobeser, 1973; McArdle und Dooley-Martyn, 1985; Schlotfeldt et al., 1985; Michel et al., 1986).

Ursache für das plötzliche Auftreten der Krankheit, die bis 1981 in Europa unbekannt war, wäre möglicherweise die Einschleppung des Erregers durch die internationale Einfuhr von klinisch inapparent infizierten Nichtsalmoniden.

In den meisten europäischen Ländern werden die "Disease Controls" bei eingeführten Zierfischen sehr vernachlässigt. So gelang McArdle und Dooley-Martyn (1985) in Irland die Isolierung von *Yersinia ruckeri* in Reinkultur aus dem Darm eines aus Singapur frisch importierten Goldfisches.

Auf die Bedeutung von eingeführten Nichtsalmoniden als mögliche Infektionsquelle für heimische Salmoniden wiesen ebenfalls Michel et al. (1986) hin. Sie konnten aus frisch eingeführten Köderfischen

Köderfischen (*Pimephales promelas*), aus den USA stammend, *Yersinia ruckeri* isolieren. Diese Köderfische, die nach Europa exportiert werden, finden eventuell durch Sport- und Freizeitfischer eine rasche und weite Ausbreitung. So wäre ein plötzliches Auftreten der Krankheit an verschiedenen Orten in Europa zu erklären.

Ungeklärt bleibt weiterhin der Übertragungsmodus.

Die Erregerübertragung nimmt ihren Ausgang in der Regel durch Ausscheidung des Erregers aus erkrankten oder klinisch inapparent infizierten Organismen.

Eine Quelle der Verbreitung kann ebenfalls das ganze Tier bzw. Teile davon sein, wenn sie als Beute gefressen werden oder als Kadaver ihre Umwelt verunreinigen (Mayr, 1985).

Auf diese Weise kann auch der Erreger der BRM innerhalb der natürlichen Nahrungskette von den kleinen, im Wasser lebenden Beutetieren (Elritze, Flußkrebis), die ihrerseits durch Aufnahme von Aas bzw. kontaminiertem Detritus sich infizieren, auf die größeren Raubfische (Salmoniden, Hecht, Aal) übertragen werden.

In den Seren, der in dieser Arbeit experimentell infizierten Regenbogenforellen, wurden bereits am 20. Tag nach einmaliger Infizierung durch parenteral verabreichtes *Yersinia ruckeri*-O-Antigen spezifische Antikörpertiter bis zu 128 ermittelt.

Daß nicht alle Fischpathogene eine solche, ausgeprägte Immunantwort nach parenteraler Applikation zur Folge haben, konnte Vestergard Jorgensen (1971) demonstrieren: Regenbogenforellen wurden im Experiment intraperitoneal mit dem Erreger der VHS (Egtvedvirus) beimpft. Antikörper konnten bei den überlebenden Fischen erst 12 bis 18 Monate später ermittelt werden, nachdem bereits ein Teil der Fische an VHS verendet war. Die serologische Untersuchung auf Antikörper gegen das VHS-Virus ist also im Rahmen einer Bestandskontrolle vergleichsweise weniger aussagekräftig. Anders verhält es sich im Falle der BRM. Hier kann die serologische Untersuchung etwa ab dem 20. Tag p.i. Aufschluß darüber geben, ob eine Fischpopulation sich mit dem Erreger der Rotmaulseuche auseinandergesetzt hat oder nicht.

Die Ursache dafür, daß Jorgensen erst Monate nach der Infektion

spezifische Antikörper im Serum der Fische finden konnte, mag daran gelegen haben, daß entweder die Infektionsdosis zu hoch gewählt war, was eine immunologische Paralyse zur Folge gehabt hätte, oder daß das VHS-Virus direkt das hamatopoetisch-immunobiologische System der Kopfniere schädigte (Amlacher, 1986), und somit die Antikörperbildung der Forellen unterdrücken konnte. Eine solche Immunsuppression wird durch *Yersinia ruckeri* offensichtlich nicht hervorgerufen. Aufgrund der Dynamik der Antikörperproduktion (Immunantwort) der experimentell infizierten Regenbogenforellen muß *Yersinia ruckeri* als ein potentes Immunogen angesehen werden.

Von einer der experimentell infizierten Regenbogenforellen konnte sowohl am 20.Tag p.i. als auch am 30.Tag p.i. Blut zu serologischen Untersuchungen gewonnen werden. Die IHA am 20.Tag p.i. erbrachte einen Antikörpertiter gegen *Yersinia ruckeri* von 8. Am 30.Tag p.i. wurde ein Titer von 16 ermittelt. Dieser Befund steht in Einklang mit den Ergebnissen aus *Yersinia ruckeri* "Challenge-Versuchen" von Anderson et al. (1979 und 1984). Durch tägliche Untersuchungen konnten sie die Dynamik der Antikörperproduktion messen. Humorale Antikörper konnten mittels der IHA ab dem 17.Tag p.i. ermittelt werden. Maximaltitern wurden am 28.Tag p.i. gemessen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten serologischen Untersuchungsmethoden zum Nachweis von Antikörpern gegen *Yersinia ruckeri* bei allen untersuchten Fischarten befriedigende Ergebnisse lieferten. Bedingt durch die immunogene Wirkung von *Yersinia ruckeri*, erscheinen im Serum infizierter Fische schon nach kurzer Zeit meßbare Antikörpertiter. Somit wäre die serologische Untersuchung auf Antikörper gegen *Yersinia ruckeri* im Rahmen einer Bestandskontrolle sicherlich von Nutzen. Aufgrund der individuell verschiedenen Immunantwort gibt die Serologie nur Aufschluß darüber, ob sich eine Fischpopulation mit dem Erreger der Rotmaulseuche auseinandergesetzt hat oder nicht. Anders als beim Säuger läßt der Titer der einzelnen Seren keinen

Schluß auf den bestehenden Immunstatus zu.

Die serologischen Untersuchungsergebnisse weisen auf eine weite Verbreitung des ERM-Erregers in Süddeutschland hin.

V. Zusammenfassung

Das Vorkommen von Antikörpern gegen den Erreger der Rotmaulseuche, *Yersinia ruckeri*, bei Salmoniden und Nichtsalmoniden in Süddeutschland sowie bei experimentell infizierten Fischen wurde mittels der Objektträgeragglutination und der Indirekten Hamagglutination untersucht.

Dabei wurden folgende Ergebnisse erbracht:

1. 425 (91,2%) von 466 untersuchten Fischseren reagierten in der OA und in der IHA einheitlich. Davon reagierten 403 (86,5%) negativ und 22 (4,7%) Seren positiv.
Bei 4 Seren war die Untersuchung in der IHA positiv, während die OA eine negative Reaktion erbrachte.
2. Positive Reagenten wurden sowohl bei freilebenden als auch bei aus der Teichwirtschaft stammenden Salmoniden und Nichtsalmoniden ermittelt. Antikörper gegen *Yersinia ruckeri* wurden erstmals im Serum vom Gräsfisch (*Ctenopharyngodon idella*) nachgewiesen.
3. In 9 von 17 untersuchten Fischzuchten wurden positive Reagenten ermittelt.
4. Die Zahl der positiven Reagenten innerhalb der untersuchten Regenbogenforellenpopulation stieg von 6,7% im Jahr 1984 auf 9,1% im Jahr 1986.
5. Im Serum von experimentell infizierten Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) konnten ab dem 20. Tag p. i. hohe Antikörpertiter gegen *Yersinia ruckeri* nachgewiesen werden.

VI. Summary:

Serological studies on the occurrence of *Yersinia ruckeri* in Southern Germany

The occurrence of antibodies against the causative agent of redmouth disease, *Yersinia ruckeri*, in salmonid and non-salmonid fishes from Southern Germany was investigated by the slide agglutination test and by the passive haemagglutination test.

The following results were produced:

1. 425 (91.2%) of 466 examined fish sera reacted corresponding in the slide agglutination test (OA) and the passive haemagglutination test (IHA). 403 (86.5%) reacted negative and 22 (4.7%) of the sera reacted positive.
The examination of 4 serum samples produced positive reactions when tested by the IHA, but negative reactions when tested by the OA-test.
2. Positive reactants were detected among wild as well as among domesticated salmonid and non-salmonid fishes. For the first time antibodies against *Yersinia ruckeri* were found in the serum of grassfish (*Ctenopharyngodon idella*).
3. Positive reactants were detected in 9 of 17 examined fish-hatcheries.
4. The number of positive reactants among the examined rainbow trout population rose from 6.7% in the year 1984 to 9.1% in the year 1986.
5. High titres of antibodies against *Yersinia ruckeri* could be detected in experimentally infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*) from the 20 th day post infectionem.

VII. Literaturverzeichnis

- Alexander, J. B., Ingram, G. A., Shamschoom, S. M. and
Bowers, A. (1983):
Antigen clearance in trout.
Dev. Comp. Immunol. 7, 707-708
- Amend, D. F. and Johnson, K. A. (1984):
Evidence for lack of antigenic competition among
various combinations of *Vibrio anguillarum*, *Yersinia*
ruckeri, *Aeromonas salmonicida* and *Renibacterium*
bacterius when administered to salmonid fishes.
J. Fish Dis. 7, 293-299
- Amend, D. F., Johnson, K. A., Croy, T. R. and
McCarthy, D. H. (1983):
Some factors affecting the potency of *Yersinia*
ruckeri bacterins.
J. Fish Dis. 6, 337-344
- Amlacher, E. (1986):
Taschenbuch der Fischkrankheiten. 5. Auflage.
Gustav Fischer Verlag, Jena
- Anderson, D. P., Dixon, O. W. and Roberson, B. S. (1979):
Kinetics of the primary immune response in rainbow
trout after flush exposure to *Yersinia ruckeri*
O-antigen.
Dev. Comp. Immunol. 3, 739-744
- Anderson, D. P., Merchant, B., Dixon, O. W., Schott, C. F. and
Lizzio, E. F. (1983):
Flush exposure and injection immunisation of rainbow
trout to selected DNP conjugates.
Dev. Comp. Immunol. 7, 261-268

- Anderson, D. P., Muiswinkel van, W. B. and Roberson, B. S. (1984):
Effects of chemically induced immune modulation on
infectious diseases of fish.
Chemical regulation of immunity in veterinary medicine
Alan R. Liss, Inc., New York, 187-211
- Anderson, D. P., Roberson, B. S. and Dixon, O. W. (1979):
Cellular immune response in rainbow trout *Salmo
gairdneri* Richardson to *Yersinia ruckeri* O-antigen
monitored by passive haemolytic plaque assay test.
J. Fish Dis. 2, 169-178
- Austin, B. and Allen-Austin, D. (1985):
Bacterial pathogens of fish.
J. Appl. Bacteriol. 58, 483-506
- Austin, B. and Austin, D. A. (1987):
Enterobacteriaceae representatives
In: Austin B. and Austin D., Bacterial fish pathogens
Disease in farmed and wild fish, Ellis Horwood Ltd.,
Halsted Press, Chichester
- Avtalion, R. A., Wojdani, A., Malik, Z., Shahrabani, R. and
Duczyminer, M. (1973):
Influence of environmental temperature on the immune
response in fish.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 61, 1-35
- Bercovier, H. and Mollaret, H.H. (1984):
Genus XI. *Yersinia* Van Loghem 1944.
In: Buchanan, R.E. and Gibbons, Bergey's manual of
systematic bacteriology, Volume 1, The Williams &
Wilkins Co., Baltimore

Bisset, K.A. (1948):

The effect of temperatur upon antibody production in cold-blooded vertebrates.

J. Path. Bact. 60, 87-92

Bosse, Marie P. and Post, G. (1983):

Tribrissen and tiamulin for control of enteric redmouth disease.

J. Fish Dis. 6, 27-32

Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G., Falcao, D.P., Weaver, R.E. and Fanning, G.R. (1976):

Characterization of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* by desoxyribonucleic acid hybridization and by biochemical reactions.

Int. J. Syst. Bacteriol. 26, 180-194

Brown, S.L., Klein, G.C., McKinney, F.T. and Jones, W.L. (1981):

Safranin O-stained antigen microagglutination test for detection of *Brucella* antibodies.

J. Clin. Microbiol. 13, 398-400

Bullock, G.L. and H.M. Stuckey (1975):

Fluorescent antibody identification and detection of the corynebacterium causing kidney diseases of salmonids.

J. Fish. Res. Board Can. 32, 2224-2227

Bullock, G.L. and Sniessko, S.F. (1975):

Hagerman redmouth, a disease of salmonids caused by a member of the Enterobacteriaceae.

U.S. Fish Wildl. Ser., Fish Dis. Leaflet 57, 1-7

- Bullock, G.L., Stuckey, H.M. and Herman, R.L. (1976):
Comparative susceptibility of atlantic salmon
(*Salmo salar*) to the redmouth bacterium and
Aeromonas salmonicida.
J. Wildl. Dis. 12, 376-379
- Bullock, G.L., Stuckey, H.M. and Shotts, E.B. (1977):
Early records of North American and Australian
outbreaks of enteric redmouth disease.
Fish Health News 6, 96-97
- Bullock, G.L., Stuckey, H.M. and Shotts, Jr., E.B. (1978):
Enteric redmouth bacterium: comparison of isolates
from different geographic areas.
J. Fish Dis. 1, 351-356
- Bullock, G.L. und Anderson, D.W. (1984):
Immunization against *Yersinia ruckeri*, cause of enteric
redmouth disease.
In: DeKinkelin, P. (ed.), Symposium on Fish Vaccination;
Theoretical Background and Practical Results on Immunization
against Infectious Diseases, Paris, Office
International des Epizooties, p. 151-166
- Busch, R.A. (1973):
The serological surveillance of salmonid populations for
presumptive evidence of specific disease association.
Ph. D. Dissertation, University of Idaho.
- Busch, R. A. and Lingg A. J. (1975):
Establishment of an asymptomatic carrier state
infection of enteric redmouth disease in rainbow
trout (*Salmo gairdneri*).
J. Fish. Res. Board Can. 32, 2429-2436

Busch, R.A. (1978):

Enteric redmouth disease (Hagerman strain).

Marine Fisheries Review 40, 42-51

Busch, R. A. (1981):

The current status of diagnostic serology for the major bacterial diseases of fish.

Develop. Biol. Stand. 49, 85-96

Cherry, W.B., Goldmann, M. and Corski, T.R. (1960):

Fluorescent antibody techniques in the diagnosis of communicable diseases.

US Gov. Print. Off., Washington, D.C.

Conrath, T.B. (1972):

Handbook of microtiter procedures.

Dynatech Corp., Cambridge, Mass.

Coons, A.H., Creech, H.J. and Jones, R.N. (1941):

Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group.

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 47, 200

Cossarini-Dunier, M. (1986):

Protection against enteric redmouth disease in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, after vaccination with *Yersinia ruckeri* bacterin.

J. Fish. Dis. 9, 27-33

Dalsgaard, J., From, J. and Horlyck, V. (1984):

First observation of *Yersinia ruckeri* in Denmark.

Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 4, 10.

- Daly, J. G., Lindvik, B. and Stevenson, R. M. W. (1986):
Serological heterogeneity of recent isolates of
Yersinia ruckeri from Ontario and British Columbia.
Dis. aquat. Org. 1, 151-153
- Dorson, M., Barde, A. and P. de Kinkelin (1975):
Egdded virus induced rainbow trout interferon: some
physicochemical properties.
Ann. Microbiol. 126 B, 485-489
- Dulin, M.P., Huddleston, T.R., Larson, R. and Klontz, G. (1976):
Enteric redmouth disease.
Forest Wildlife and Range Experimental Station,
University of Idaho Bulletin 8, 1-15
- Ellis, A. E. (1977 a):
The leucocytes of fish: A review.
J. Fish Biol. 11, 453-491
- Ellis, A. E. (1977 b):
Ontogeny of the immune response in *Salmo salar*.
Histogenesis of the membrane immunoglobulin and mixed
leucocyte reactivity.
In: Solomon, J.B. and Horton, J. D., *Developmental
Immunobiology*, Elsevier/North Holland Biochemical
Press, Amsterdam
- Ellis, A. E. (1982):
Differences between the immune mechanisms of fish and
higher vertebrates.
In: Roberts, R. J., *Microbial Disease of Fish*, Special
Publications of the Society for General Microbiology,
Nr. 9, Academic Press, London

- Ellis, A. E. und Schlotfeldt, H. J. (1985):
Immunologie der Knochenfische.
In: Roberts, R.J. Schlotfeldt, H.J., Grundlagen der
Fischpathologie, Verlag Paul Parey, Berlin und
Hamburg
- Ewing, W. H., Ross A. J., Brenner, D. J. and Fanning, G. R.
(1978):
Yersinia ruckeri sp. nov., the Redmouth (RM)
Bacterium
International Journal of Systematic Bacteriology,
28, 37-44
- Frerichs, G. N. and Hendrie, M. S. (1985):
Bacteria Associated with Diseases of Fish
In: Collins, C.H. and Grange, J. M., Isolation and
Identification of Microorganisms of Medical and Veterinary
Importance, Academic Press, London
- Frerichs, G. N., Stewart, J. A. and Collins, R. O. (1985):
Atypical infection of rainbow trout, *Salmo gairdneri*
Richardson, with *Yersinia ruckeri*.
J. Fish Dis. 8, 383-387
- Fryer, J.L., Nelson, J.S. and Garrison, F.L. (1978):
Immunisation of salmonids for control of vibriosis.
Marine Fisheries Review 40, 20-23
- Fuhrmann, H., Böhm, K.H. and Schlotfeldt, H.-J. (1984):
On the importance of enteric bacteria in the
Bacteriology of freshwater fish.
Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 4, 42-46

- Fuhrmann, H., Böhm, K.H. and Schlotfeldt H.-J., (1983):
An outbreak of enteric redmouth disease in
West Germany.
J. Fish Dis. 6, 309-311
- Giorgetti, G., Geschia, G. and Sarti, M. (1985):
Evolution of bacterial pathology in Italian fresh water
trout farms.
2. International Conference of the BAFP, Montpellier,
France, Sept. 2-5, 1985
- Giorgetti, G., Geschia, G. and Bovo, G. (1985):
First isolation of *Yersinia ruckeri* in farmed rainbow
trout in Italy.
In: Fish and Shellfish Pathology, ed. Ellis, A.E.,
Academic Press, New York
- Green, M. and Austin, B. (1982):
The identification of *Yersinia ruckeri* and its relation-
ship to other representatives of the Enterobacteriaceae.
Aquaculture 34, 185-192
- Hansen, C. B. and Lingg, A. J., (1976):
Inert Particle Agglutination Tests for Detection of
Antibody to Enteric Redmouth Bacterium.
J. Fish Res. Board Can. 33, 2857-2860
- Hester, F.E. (1973) :
Fish health: a nationwide survey of problems and needs.
Prog. Fish Cult. 35, 11-18

Herbert, W.J. (1974):

Passive haemagglutination with special reference to the tanned cell technique.

In: Weir, D.M., Handbook of Experimental Immunology, Immunochemistry, 3. Auflage, Blackwell Scientific Publications, London

Horlyck, V., Dalsgaard, J., From, J., Olesen, N.J. and

Vestergaard Jorgensen, P.E. (1985):

Observations on enteric redmouth in Denmark. -

2. International Conference of EAEP, Montpellier, France, Sept. 2-5, 1985

Hunter, V. A., Knittel, M. D. and Freyer, J. L. (1980):

Stress- induced transmission of *Yersinia ruckeri* infection from carriers to recipient steelhead trout *Salmo gairdneri* Richardson.

J. Fish Dis. 3, 467-472

Ingram, G. A. and Alexander, J. B. (1976):

The immune response of brown trout (*Salmo trutta*) to injection with soluble antigens.

Acta biol. med. germ., 35, 1561-1570

Ingram, G. A. and Alexander, J. B. (1977)

Serum protein changes in brown trout (*Salmo trutta* L.) after single injections of soluble and cellular antigens.

J. Fish Biol. 11, 283-291

Ingram, G. A. and Alexander, J. B. (1977):

The primary immune response of brown trout (*Salmo trutta*) to injection with cellular antigens.

J. Fish Biol., 10, 63-72

Ingram, G. A. and Alexander, J. B. (1979):

The immunoglobulin of the brown trout (*Salmo trutta*) and its concentration in the serum of antigen-stimulated and non-stimulated fish.

J. Fish Biol., 14, 249-260

Ingram, G. A. and Alexander, J. B. (1980):

The immune response of the brown trout (*Salmo trutta*) to lipopolysaccharide.

J. Fish Dis., 16, 181-197

Ingram, G. A. and Alexander, J. B. (1980):

A comparison of the immune response of the brown trout (*Salmo trutta*) to a protein and a carbohydrate antigen.

In: Solomon, J. B., Aspects of Developmental and Comparative Immunology-I, Pergamon Press, Oxford

Ingram, G. A. and Alexander, J. B. (1981):

The primary immune response of brown trout (*Salmo trutta*) to cellular and soluble antigens: Enumeration of antibody-binding cells and the production of antibody.

Acta biol. med. germ., 40, 317-330

Ingram, G. A. (1985):

The immune response of brown trout, *Salmo Trutta* to sheep and human 'O' erythrocytes.

In: Manning, M. J. and Tatner, M. F., Fish Immunology, Academic Press, London

Johnson, G. R., Wobeser, G. and Rouse, B. T. (1974):

Indirekt fluorescent antibody technique for detection of RM bacterium of rainbow trout (*Salmo gairdneri*).

J. Fish. Res. Board Can. 31, 1957-1959

Johnson, K. A. and Amend, D. F. (1983):

Comparison of efficacy of several delivery methods
using *Yersinia ruckeri* bacterin on rainbow trout,
Salmo gairdneri Richardson.

J. Fish Dis. 6, 331-336

Jurd, R.D. (1985):

Specialisation in the teleost and anuran immune
response: A comparative critique.

In: Manning, M.J. and Tatner, M.F., Fish Immunology,
Academic Press, London

Klontz, G.W., Yasutake, W.T. and Parisat, T.J. (1965):

Virus diseases of the Salmonidae in Western United
States. III. Immunopathological aspects.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 126, 531-542

Lamers, C. H. J. and Muiswinkel van, W. B. (1981):

Primary and secondary immune responses in carp
(*Cyprinus carpio*) after administration of
Yersinia ruckeri O-antigen.

Fish Diseases-Enfermedades de los Peces, Fourth
COPRAQ Session, Cadiz 1981, Hersg. Acnigrup, Spain

Lesel, R., Lesel, M., Gavini, F. and Vuillaume, A. (1983):

Outbreak of enteric redmouth disease in rainbow
trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in France.

J. Fish Dis. 6, 385-387

Lewis, D.H. and Allison, T.C. (1971):

An immunofluorescent technique for detecting *Aeromonas*
liquifaciens in fish utilized in lunar exposure studies.

Trans. Am. Fish. Soc. 100, 575-578

Llewellyn, L. C. (1980):

A bacterium with similarities to the redmouth bacterium and *Serratia liquefaciens* (Grimes and Hennerty) causing mortalities in hatchery reared salmonids in Australia.

J. Fish Dis. 3, 29-39

Manning, M.J., Grace, M.F. and Secombes, C.J. (1982):

Developmental aspects of immunity and tolerance in fish.

In: Roberts, R.J., Microbial Diseases of Fish,

Academic Press, London

Mayr, A., Bachmann, P. A., Bibrack, B. und Wittmann, G. (1977a):

Virologische Arbeitsmethoden (Band I).

G. Fischer Verlag, Stuttgart, W.J.

Mayr, A., Bachmann, P. A., Bibrack, B. und Wittmann, G. (1977b):

Virologische Arbeitsmethoden, (Band II).

G. Fischer Verlag, Stuttgart, W-J.

McArdle, J. F. and Dooley-Martyn, C. (1985):

Isolation of *Yersinia ruckeri* Type 1 (Hagerman Strain) from goldfish *Carassius auratus*. (L).

Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 5, 10-11

McCarthy, D. H. and Johnson, K. A. (1982):

A serotypic survey and cross-protection test of North American field isolates of *Yersinia ruckeri*.

J. Fish Dis. 5, 323-328

Michel, C., Faivre, B. and Kinkelin, P. (1986):

A clinical case enteric redmouth in minnows (*Pimephales promelas*) imported in Europe as bait-fish.

Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 6, 97-99

Moos, M. und Jungbäck, C. (1986):

Kriterien und Probleme bei der Zulassung und Chargenprüfung von Fischimpfstoffen.

In: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., München, pp. 58-62

Muiswinkel van, W.B., Anderson, D.P., Lamers, C.H.J., Egberts, E. Loon van, J.J.A. and Ijssel, J.P. (1985):

Fish immunology and fish health.

In: Manning, M.J. and Tatner, M.F., Fish Immunology, Academic Press, London

Müller, F. (1986):

Serologische Untersuchungen über die Verbreitung der bakteriellen Nierenerkrankung (BKD) im Süden Baden-Württembergs.

Vet. Med. Diss., München

Munro, A.L.S. (1982):

The Pathogenesis of Bacterial Diseases of Fishes.

In: Roberts, R.J., Microbial Diseases of Fish, Academic Press, London

Newman, S.G. and Majnarich, J.J. (1982):

Direct immersion vaccination of juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), with a *Yersinia ruckeri* bacterin.

J. Fish Dis. 5, 339-341

O'Leary, P.J., Rohovec, J.S. and Freyer, I.L. (1979):

A further characterization of *Yersinia ruckeri* (Enteric Redmouth Bacterium).

Fish Pathology, 14, 71-78

- O'Leary, P.J., Rohovec, J.S., Sanders, J.E., Fryer, J.L. (1982):
Serotypes of *Yersinia ruckeri* and Their immunogenic properties. Sea Grant College Program Publication No. ORESU-T-82-001, Oregon State Univ., Corvallis, Oregon, 1-15
- Post, G. (1963):
The immune response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to *aeromonas hydrophila*.
State of Utah Department of Fish and Game,
Department Information Bulletin, U.S.A.
- Riggs, I. L. and Brown, G. C. (1961):
Direct and indirect immunofluorescence of enteroviruses.
Bact. Proc. 23, 145
- Rintamäki P., Valtonen, T. E. and Frerichs, G. W. (1986):
Occurrence of *Yersinia ruckeri* infection in farmed whitefish, *Coregonus peled* Gmelin and *Coregonus muksun* Pallas, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in northern Finland.
J. Fish Dis. 9, 137-140
- Roberts, R.J. (1978):
The Bacteriology of Teleosts.
In: Roberts, R. J., Fish Pathology, Bailliere Tindall, London
- Roberts, R.J. (1985):
Bakteriologie.
In: Roberts, R.J./Schlotfeldt, H.J., Grundlagen der Fischpathologie, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

Roberts, M.S. (1983):

A report of an epizootic in hatchery reared rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, at an English trout farm, caused by *Yersinia ruckeri*.

J. Fish Dis. 6, 551-552

Rolle, M. und Mayr, A. (1985):

Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.

5. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart

Ross, A. J., Rucker, R. R. and Ewing, W. H. (1966):

Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairneri*).

Can. J. Microbiol. 12, 763-770

Rübsamen, S. and Weis, J. (1985):

Nachweis von Enteric Redmouth Disease bei Regenbogenforellen, *Salmo gairdneri* Richardson, in Südbaden.

Tierärztliche Umschau 40, 995-998

Sakai, D.K. (1981 b):

Heat inactivation of complement and immune haemolysis reaction in rainbow trout, masou salmon, coho salmon, goldfish and tilapia.

Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 47, 565-571

Schäperclaus, W. (1979):

Fischkrankheiten. 4. Aufl., Akademie Verlag, Berlin

Schauner, M. (1985):

Untersuchungen zum serologischen Nachweis von der Bakteriellen Nierenerkrankung (BKD) der Salmoniden.

Vet. Med. Diss., München

Schliesser, T. (1982):

Immunologie.

In: Stünzi, H. und Weiss, E., Allgemeine Pathologie,
7. Auflage, Paul Parey Verlag, Berlin

Shotts, E. and Bullock, G. L., 1975:

Bacterial Diseases of Fishes: Diagnostic Procedures
from Gram-Negative Photogens.

J. Fish. Res. Board of Canada 32, 1243-1247

Schlotfeldt, H.-J., Böhm, K. H., Pfortmüller, F., Pfortmüller, K.
(1985):

Rotmaulseuche/ERM (Enteric Redmouth Disease) der
Forelle und anderen Nutzfischen in Nordwestdeutschland-
Vorkommen, Therapie und Vakzinierungsergebnisse.
Tierärztl. Umschau 40, 985-995

Schlotfeldt, H.-J., Böhm, K.H., Pfortmüller, F. und
Pfortmüller, K. (1986):

Rotmaulseuche/ERM (Enteric Redmouth Disease) der
Forelle und anderer Nutzfische in Nordwestdeutschland-
Vorkommen, Behandlung und erste Schutzimpfungs
(Vakzinierungs)-Ergebnisse.
Fischer und Teichwirt 37, 18-21

Seeliger, H.P.R., (1978):

Serologische Untersuchung.

In: Seeliger, H.P.R., Taschenbuch der medizinischen
Bakteriologie, Würzburg

Smith, P.D., McCarthy, D.H. and Paterson, W.D. (1980):

Further studies on furunculosis vaccination.

In: Fish Diseases, Third COPRAQ-Session (ed. by W.Ahne).
113-119, Springer Verlag Berlin.

- Steigerwalt, A. G., Fanning, G. R., Fife-Asbury, M. A. and
Brenner, D. J. (1976):
DNA relatedness among species of *Enterobacter* and
Serratia.
Can. J. Microbiol. 22, 121-137
- Stevenson, R. M. W. and Daly, J. G. (1982):
Biochemical and Serological Characteristics of
Ontario Isolates of *Yersinia ruckeri*.
Can. J. Fish Aqua. Sci. 39, 870-876
- Stevenson, R. M. W. and Airdrie, D. W. (1984):
Serological variation among *Yersinia ruckeri* strains.
J. Fish Dis. 7, 247-254
- Vestergard Jørgensen, P. E. (1971):
Egtved Virus: Demonstration of Neutralizing Antibodies
in Serum from Artificially Infected Rainbow Trout
(*Salmo gairdneri*).
J. Fish Res. Bd. Can. 28, 875-877
- Warren, J. W. (1983):
Enteric redmouth disease.
In: Meyer, F. P., Warren, J. W. and Carey, T. G.,
A guide to integrated fish health management in the
great lakes basin, Great Lakes Fishery Commission,
Ann Arbor, Michigan Spec. Pub. 83-2
- Wishkovsky, A. and Avtalion, R. R. (1982):
Induction of helper and suppressor functions in carp
(*Cyprinus carpio*) and their possible implication in
seasonal disease in fish.
Dev. Comp. Immunol. Suppl. 2, 83

Wobeser, G. (1973):

An outbreak of redmouth disease in rainbow trout
(*Salmo gairdneri*) in Saskatchewan.

J. Fish. Res. Board Can. 30, 571-575.

Yamaguchi, N., Teshima, C., Kurashige, S., Saito, T. and
Mitsuchashi (1980):

Seasonal modulation of antibody formation in rainbow
trout (*Salmo gairdneri*).

In: Solomon, J.B., Aspects of Developmental and
Comparative Immunology I., Pergamon Press, Oxford

Yasutake, W.T. (1975):

Fish viral diseases: clinical, histopathological and
comparative aspects.

In: Ribelin, W.E. und G. Migaki, The Pathologie of
Fishes, University of Wisconsin Press

Herrn Prof. Dr. R. Hoffmann danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas und für seine freundliche Unterstützung bei der Erstellung und Korrektur dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. C. Pfeil-Putzien für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die sachliche Anleitung bedanken.

Herrn Busch danke ich für die gute Betreuung der Versuchstiere.

LEBENSLEBE

Name: William Noel Anderson

Geburtsdatum: 12.07.1957

Geburtsort: München, Bayern

Eltern: William Aaron Anderson
Allegra Ruth Anderson, geb. Redding

Schulbildung: April 1964 Volksschule in Hagen
Marz 1967 Volksschule in Detmold
Sept. 1968 Glen Cove Intermediate School, USA
Sept. 1971 Ruprecht Gymnasium in München
Sept. 1972 Gymnasium Ernestinum in Coburg

24.06.1977 Allgemeine Hochschulreife

Studium: WS 77/78 bis WS 78/79 Physik an der
LMU München
WS 78/79 Studium der Tiermedizin an der
LMU München
Abschluß: Staatsexamen am 20.07.1984

Promotionsstudium: Ab Dezember 1985 am Institut für Zoologie und
Hydrobiologie der Tierärztlichen Fakultät der
LMU München

Approbation: 29.09.1987

